

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIELA REGINA BUCH

TOXINAS LOXOSCÉLICAS: ESTUDO DA CONSERVAÇÃO BIOLÓGICA POR
MEIO DE IMUNOENSAIOS

CURITIBA

2014

DANIELA REGINA BUCH

TOXINAS LOXOSCÉLICAS: ESTUDO DA CONSERVAÇÃO BIOLÓGICA POR
MEIO DE IMUNOENSAIOS

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, Programa de Pós-Graduação do Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dra. Andrea Senff Ribeiro
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Olga Meiri Chaim

CURITIBA

2014

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:



Profa. Dra. Andrea Senff Ribeiro
Orientadora e presidente da banca
Departamento de Biologia Celular - UFPR



Profa. Dra. Carolina Camargo de Oliveira
Departamento Biologia Celular - UFPR



Profa. Dra. Michele Dietrich Moura Costa
Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG

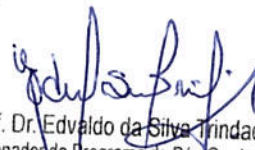
E tendo como suplente,

Prof. Dr. Francisco Filipak Neto
Departamento de Biologia Celular - UFPR

Após argüir a mestrand **Daniela Regina Buch**, em relação ao seu trabalho intitulado: **"Toxinas loxoscélicas: estudo da conservação biológica por meio de imunoensaios"**, são de parecer favorável à APROVAÇÃO da acadêmica, habilitando-a ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 27 de Abril de 2012



Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 185795

À toda minha família, aos meus pais Tania e Lourival que se doaram inteiramente para a minha formação pessoal e profissional, por serem verdadeiros exemplos de humildade, honestidade e amor incondicional! Aos meus irmãos, Marcio e Alexandre que foram peças fundamentais no meu desenvolvimento.

Em especial a duas pessoas, ao meu pai e ao meu irmão Marcio, pelas preciosas lições. Hoje podem estar longe dos olhos mas estão muito perto do meu coração.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha vida e por todas as oportunidades!

À minha orientadora, Prof^a Dra. Andrea Senff Ribeiro, primeiramente pela oportunidade de crescimento profissional, se não nada seria possível. Pela confiança, compreensão, ajuda, pelos ensinamentos, sugestões e conselhos. Pelo exemplo de profissional. Meus eternos agradecimentos!

À minha co-orientadora, Prof^a. Dra. Olga Meiri Chaim, pelos ensinamentos, conselhos. Pela oportunidade do estágio em docência e exemplo de profissional.

Ao professor Dr. Silvio Sanches Veiga, pela oportunidade, pela sugestão de projeto, pelos conhecimentos e pelo grande exemplo de dedicação.

À Coordenação do Curso de Pós Graduação do Departamento de Biologia Celular, pelas informações, pela disposição e empenho em ajudar.

À todos os professores das disciplinas, do Departamento de Biologia Celular, do Departamento de Fisiologia e do Instituto Carlos Chagas.

Aos colegas e amigos das disciplinas, obrigada pelo companheirismo.

Ao Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos do Paraná, pela contribuição para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Laboratório de Histotecnologia do Departamento de Biologia Celular, em especial ao Sr. Herculano Salviano dos Reis (Seu Nino) pela ajuda, pela atenção, pelo exemplo de paciência, dedicação, profissionalismo e simpatia.

Aos professores do programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Prof^o Dr. Rubens Bertazolli Filho e Prof^a Dra. Lucélia Donatti que

acompanharam meus projetos e pelas sugestões feitas na defesa do projeto dessa dissertação.

À banca examinadora dessa dissertação composta pela Dra. Carolina Camargo de Oliveira e Dra. Michele Dietrich Moura Costa, por terem prontamente aceitado o convite.

À Marlene S. Camargo, secretária do programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular pela disposição em ajudar.

À todos os funcionários da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas pela disposição em ajudar.

À todos os funcionários do Biotério da UFPR.

À todos funcionários do Departamento de Biologia Celular pela paciência e disposição em ajudar.

Aos porteiros Seu Luiz e Tião do Setor de Ciências Biológicas pela simpatia, bom humor especial e diário.

E finalmente e em especial à todos os integrantes e amigos do Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos que compartilharam comigo horas e horas diárias nestes dois últimos anos:

À Dra. Luiza Helena Gremski (Lu) exemplo de dedicação e profissionalismo. Lu quando for ao Schimmel é só chamar!

À Valéria Pereira Ferrer (Val). Val obrigada pela paciência em me ajudar com nosso suado alinhamento e quando for organizar alguma festa surpresa te chamo pra animar e organizar a festa, viu?!

À Dilza Trevisan Silva (ôô...Dill), por várias dicas experimentais. Dil obrigada pelo ombro amigo que muitas vezes deixei encharcado e por compartilhar músicas da Legião Urbana em momentos complicados.

Ao Fernando Hitomi Matsubara (Fer ou Ferxetina). Obrigada Fer por você ser assim, e pelas oportunidades de altas rizadas que me animavam diariamente.

À Fernanda Nunes Souza (Fer), pelas ajudas. Obrigada Fer pelo alívio proporcionado quando falava com seu jeitinho mineiro: “não se preocupe estamos juntas nessa”.

À Kiane Freitas da Silva. Obrigada Kiane pela indicação no apelido do Fer, mas principalmente pela amizade!

Ao Gabriel Otto Meissner, pelas contribuições para o desenvolvimento desse trabalho. Obrigada Gabriel pelos momentos tranquilizantes em que você falava: “nada grave...”

Ao Thiago Lopes de Mari (Ti). “Como está o sofredor?”

À Daniele Chaves Moreira (Dani). Desculpa pelo sangue na calça, no tênis, no jaleco,!

À Larissa Vuitika (Lari). Lari obrigada por me ajudar a tirar sarro do Fer!

À Marianna Boia Ferreira (Mari). Acho melhor não dividirmos mais o quarto do hotel...hahaha!

À Aline Viana Bednaski. “Oh rapaz...” Aline muito obrigada por dividir as experiências em docência nas aulas de Bio Cel.

Ao Matheus Regis Belisário. Ah se o pezinho for para frente... Matheus daqui uns anos você vai lá em casa comer jabuticaba.

Ao Adriano Marcelo Morgon. Adriano que tal um bife a parmegiana?

À Marta de Mauro Oliverio. Marta vamos jogar UNO com a Evelin de madrugada? Me diverti muitooo!

À Mariana Gabriel Magnoni. Obrigada pelas discussões sobre história e qualquer coisa resolvemos na bicuda.

À Ana Carolina Martins Wille. Obrigada por dividir as aflições relacionadas aos experimentos.

Ao Eduardo Soares Constantino. Te desculpo por me chamar de idosa, porque também muitas vezes me ajudou a tirar um sarro do Fer.

Enfim muito obrigada a todos por me receberem tão bem, pela paciência durante os valiosos ensinamentos, pelo companheirismo, apoio, pelas sugestões, amizade, risadas, por compartilhar as aflições e pelo carinho nos momentos difíceis!!!

Às amigas do Departamento de Fisiologia, Daniele, Isabela, Adriana e Gina por estarem sempre prontas a ajudar!!!

Ao Laboratório de Neurobiologia do Departamento de Patologia pelos empréstimos de reagentes, ajuda e equipamentos.

À todos meus amigos da graduação.

Às amigas do coração minhas desculpas por muitas vezes não poder estar presente.

Aos apoios financeiros REUNI, CAPES, Fundação Araucária FAPESP, SETI, CNPQ e ao povo que financia a UFPR.

“A persistência é o menor caminho do êxito”

Charles Chaplin

RESUMO

As aranhas do gênero *Loxosceles* (aranha marrom) estão entre os animais venenosos envolvidos com acidentes em humanos. A picada da aranha marrom pode provocar reações cutâneas locais e/ou reações sistêmicas, podendo levar à falência renal e óbito. O quadro clínico desencadeado pelo veneno nas vítimas denomina-se Loxoscelismo. As espécies de maior ocorrência no estado do Paraná são: *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*. Várias proteínas do veneno total de *Loxosceles intermedia* já foram estudadas e caracterizadas, como fosfolipases-D, metaloproteases do tipo astacinas, hialuronidase, peptídeos inseticidas, TCTP, entre outras. Este trabalho tem como objetivo principal o estudo da conservação biológica de epítomos imunogênicos de toxinas presentes nos venenos das aranhas do gênero *Loxosceles* que prevalecem no estado do Paraná. Este estudo utiliza como bioferramentas anticorpos policlonais, produzidos em coelhos, que reconhecem o veneno total de cada uma das três espécies de aranhas marrom, bem como diferentes toxinas loxoscélicas recombinantes de *L. intermedia* (isoformas de fosfolipases-D: LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3, LiRecDT5, LiRecDT6; isoforma de metaloprotease do tipo astacina: LALP1; hialuronidase; peptídeo inseticida: LiKp e TCTP). O reconhecimento de toxinas presentes nos três venenos de *Loxosceles* pelos soros policlonais que reconhecem as diferentes toxinas recombinantes de *Loxosceles intermedia* também foi avaliado. O reconhecimento imunogênico foi avaliado por meio de imunoensaios que reconhecem epítomos conformacionais (técnica de ELISA) e epítomos lineares (técnica de *western-blotting*). Os resultados obtidos revelam que as toxinas dos venenos das espécies de aranha marrom *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* apresentam conservação biológica de epítomos imunogênicos, reforçando a ideia de famílias de toxinas loxoscélicas inter-espécies. As reações cruzadas nos imunoensaios evidenciam a aplicabilidade biotecnológica de antissoros e toxinas recombinantes na prevenção, diagnóstico e tratamento do Loxoscelismo, bem como na toxinologia de forma geral.

Palavras-chaves: *Loxosceles*. Aranha marrom. Anticorpos policlonais. Toxinas loxoscélicas.

ABSTRACT

Spiders from *Loxosceles* genus (brown spiders) are among the venomous animals involved in human accidents. Brown spider bites are associated with lesions including dermonecrosis, along with systemic problems that may cause renal failure and death. Clinical effects evoked by the venom in the victims is named Loxoscelism. The main species found in the state of Paraná are *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*. Several proteins from *Loxosceles intermedia* have already been studied and characterized as: fosfolipases-D, metalloproteases from astacin family, hyaluronidase, insecticidal peptides, TCTP, etc. The present work aimed the study of the biological conservation of immunogenic epitopes from toxins found in the venom of *Loxosceles*, which are common in Paraná. This study used as biotools: polyclonal antibodies, raised in rabbits, which recognizes the venom from each of the three brown spider species; and different recombinant toxins from *L. intermedia* (fosfolipase-D isoforms: LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3, LiRecDT5, LiRecDT6; LALP1: astacin metaloprotease; LiKp: inseticidal peptide and TCTP). The recognition of toxins from the three different *Loxosceles* venoms by the polyclonal serum raised against each of the *L. intermedia* recombinant toxins mentioned above was also performed. In order to evaluate the immunogenic recognition, imunoassays that analyse conformational epitopes (ELISA) and that analyse linear epitopes (western-blotting) were used. The results show that the toxins from the venom of the three species studied herein, *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*, present biological conservation of immunogenic epitopes, reinforcing the idea of families of toxins throughout the genus. The cross-reactivity in the immunological studies point to the biotechnological applications of antiserum and recombinant toxins at prevention, diagnosis and treatment of Loxocelism, as well as, in the toxinology field in general.

Key-words: *Loxosceles*. Brown spider. Polyclonal antibodies. Loxoscelic toxins.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- ARANHA MARROM (<i>Loxosceles</i> sp).....	22
FIGURA 2- DIMORFISMO SEXUAL (<i>L. intermedia</i>).....	23
FIGURA 3- COLETA DO VENENO POR ELETROCHOQUE NO CEFALOTÓRAX.....	23
FIGURA 4- ANÁLISE DA EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA TOXINA RECOMBINANTE LIRECDT6 EM SDS-PAGE 12,5% CORADO POR COOMASSIE BLUE.....	51
FIGURA 5- REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE LiRecDT1 E ANTI- VENENOS DE <i>Loxosceles spp</i> – ELISA.....	55
FIGURA 6- REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE LiRecDT1 E ANTI- VENENOS DE <i>Loxosceles spp.</i> – <i>Western blotting</i>	55
FIGURA 7- REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE LiRecDT2 E ANTI- VENENOS DE <i>Loxosceles spp</i> – ELISA.....	56
FIGURA 8- REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE LiRecDT2 E ANTI- VENENOS DE <i>Loxosceles spp.</i> – <i>Western blotting</i>	56
FIGURA 9- REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE LiRecDT3 E ANTI- VENENOS DE <i>Loxosceles spp</i> – ELISA.....	57
FIGURA 10- REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE LiRecDT3 E ANTI- VENENOS DE <i>Loxosceles spp.</i> – <i>Western blotting</i>	57
FIGURA 11- REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE LiRecDT5 E ANTI- VENENOS DE <i>Loxosceles spp</i> – ELISA.....	58
FIGURA 12- REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE LiRecDT5 E ANTI- VENENOS DE <i>Loxosceles spp</i> – <i>Western blotting</i>	58
FIGURA 13- REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE LiRecDT6 E ANTI- VENENOS DE <i>Loxosceles spp</i> – ELISA.....	59
FIGURA 14- REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE LiRecDT6 E ANTI- VENENOS DE <i>Loxosceles spp.</i> – <i>Western blotting</i>	59
FIGURA 15- REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE LALP1 E ANTI- VENENOS DE <i>Loxosceles spp</i> – ELISA.....	62
FIGURA 16- REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE LALP1 E ANTI- VENENOS DE <i>Loxosceles spp.</i> – <i>Western blotting</i>	62

FIGURA 17- REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE HIALURONIDASE E ANTI-VENENOS DE <i>Loxosceles spp</i> – ELISA.....	63
FIGURA 18- REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE HIALURONIDASE E ANTI-VENENOS DE <i>Loxosceles spp.</i> – <i>Western blotting</i>	63
FIGURA 19- REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE LiKp E ANTI-VENENOS DE <i>Loxosceles spp</i> – ELISA.....	65
FIGURA 20- REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE LiKp E ANTI-VENENOS DE <i>Loxosceles spp.</i> – <i>Western blotting</i>	65
FIGURA 21- REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE LiTCTP E ANTI-VENENOS DE <i>Loxosceles spp</i> – ELISA.....	66
FIGURA 22- REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE LiTCTP E ANTI-VENENOS DE <i>Loxosceles spp.</i> – <i>Western blotting</i>	66
FIGURA 23- REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE SORO ANTI-LiRecDT1 E VENENOS DE <i>Loxosceles spp.</i> – ELISA.....	70
FIGURA 24- REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE SORO ANTI-LiRecDT1 E VENENOS DE <i>Loxosceles spp.</i> – <i>Western blotting</i>	71
FIGURA 25- REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE SORO ANTI-LALP1 E VENENOS DE <i>Loxosceles spp.</i> – ELISA.....	73
FIGURA 26- REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE SORO ANTI-LALP1 E VENENOS DE <i>Loxosceles spp.</i> – <i>Western blotting</i>	73
FIGURA 27- REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE SORO ANTI-HIALURONIDASE E VENENOS DE <i>Loxosceles spp.</i> – ELISA.....	74
FIGURA 28- REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE SORO ANTI-HIALURONIDASE E VENENOS DE <i>Loxosceles spp.</i> – <i>Western blotting</i>	74
FIGURA 29- REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE SORO ANTI-LiKp E VENENOS DE <i>Loxosceles spp.</i> – ELISA.....	77
FIGURA 30- REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE SORO ANTI-LiKp E VENENOS DE <i>Loxosceles spp.</i> – <i>Western blotting</i>	77
FIGURA 31- REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE SORO ANTI-TCTP E VENENOS DE <i>Loxosceles spp.</i> – ELISA.....	78
FIGURA 32- REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE SORO ANTI-TCTP E VENENOS DE <i>Loxosceles spp.</i> – <i>Western blotting</i>	78
FIGURA 33- IMUNODETECÇÃO DA TOXINA LIRECDT1 EM EXTRATOS RENAI DE CAMUNDONGOS ENVENENADOS EXPERIMENTALMENTE...	86

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- RECONHECIMENTO DAS TOXINAS RECOMBINANTES DE <i>L. intermedia</i> PELOS SOROS ANTI-VENENOS LOXOSCÉLICOS.....	82
TABELA 2- RECONHECIMENTO DAS TOXINAS PRESENTES NOS VENENOS DE <i>Loxosceles spp.</i> PELOS SOROS ANTI-TOXINAS RECOMBINANTES DE <i>L. intermedia</i>	83

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Sigla ou abreviatura	
APS	Persulfato de amônio
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indoil fosfato
BSA	Albumina de soro bovina (“Bovine Serum Albumin”)
cDNA	DNA complementar
CEEA	Comissão de ética e experimentação animal
CPPI	Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos do Estado do Paraná.
dNTPs	Mistura de nucleotídeo trifosfato (A, T, G, C)
EDTA	do inglês “Ethylenediamine tetraacetic acid”
ELISA	do inglês, “Enzyme Linked Imuno Sorbent Assay”
IgG	Imunoglobulina do tipo G
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalatopiranosídeo
kDa	Quilodaltons (unidade de massa molecular equivalente a mil daltons)
kg	Kilograma
L	Litro
LALP	do inglês, “ <i>Loxosceles astacin-like protease</i> ”
LiKp	do inglês, “ <i>Loxosceles intermedia Knotting Peptide</i> ”
LiRecDT	do inglês, “ <i>Loxosceles intermedia Dermonecrotic Recombinant Toxin</i> ”
LoxTox	do inglês, “ <i>Loxosceles tox</i> ”
M	Molar
mA	Miliampères
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MgSO₄	Sulfato de Magnésio

NaCl	Cloreto de sódio
NaH₂PO₄	Fosfato de sódio monobásico
NBT	do inglês, “nitro blue tetrazolium”
Ni-NTA	Níquel-ácido nitrilotriacético
nm	Nanômetro
OPD	Orto-fenileno diamina
PBS	Solução salina tamponada com fosfato (“phosphate buffer saline”)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
p/v	Proporção peso/volume
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio (“sodium dodecyl sulfate”)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (“sodium dodecyl sulfate-poliacrilamide gel electrophoresis”)
T.A.	Temperatura ambiente
TCTP	Translationally controlled tumor protein
TEMED	N,N,N',N'- tetrametil-etilenodiamina
Tris	Tris (hidróxidometil) aminometano.
V	Volts
v/v	Proporção volume/volume
W.B.	do inglês, “western blott”
ZnCl₂	Cloreto de zinco
µg	Micrograma
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Aranhas do gênero <i>Loxosceles</i>	20
1.2 Veneno loxoscélico	23
1.3 O uso de anticorpos como bioferramentas	31
2 OBJETIVOS	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Reagentes	37
3.2 Anticorpos	37
3.3 Quantificação de Proteínas	38
3.4 Expressão de toxina recombinante em Sistema Procarioto	39
3.4.1 Cepas de <i>E. coli</i> e vetores de expressão	39
3.4.2 Transformação bacteriana por eletroporação	39
3.4.3 Plaqueamento das bactérias transformadas	40
3.4.4 PCR de colônia e eletroforese em agarose	40
3.5 Purificação da Toxina Recombinante	41
3.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS – PAGE)	41
3.5.2 Purificação por cromatografia de afinidade em Ni ²⁺ -NTA agarose	42
3.6 Imunoensaios	43
3.6.1 Ensaios de ELISA (Enzyme Linked Imuno Sorbent Assay)	43
3.6.2 Reações de Imunodeteção (<i>western blotting</i>)	44
3.6.3 Análise estatística dos dados	46
3.7 Ensaio de Imunodeteção de toxina loxoscélica em extratos de tecidos renal de animais submetidos a envenenamento experimental com veneno de <i>L. intermedia</i>	46
3.7.1 Tratamento dos animais	46
3.7.2 Perfusão e coleta de órgãos	47
3.7.3 Preparação dos extratos	48
3.7.4 Reações de Imunodeteção em extrato renal	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 Expressão da proteína recombinante LiRecDT6 em sistema procarioto e purificação por cromatografia de afinidade em Ni ²⁺ -NTA agarose	50

4.2 Ensaio de ELISA e Imunodeteção para avaliar a conservação biológica de epítopos das proteínas presentes nos venenos de <i>Loxosceles spp</i>	51
4.2.1 Reconhecimento de toxinas recombinantes de <i>L. intermedia</i> por soros hiperimunes que reconhecem veneno total de <i>L. laeta</i> , <i>L. intermedia</i> e <i>L. gaucho</i>	54
4.2.2 Reconhecimento de toxinas do veneno total de <i>L. intermedia</i> , <i>L. laeta</i> e <i>L. gaucho</i> por soros hiperimunes que reconhecem toxinas recombinantes de <i>L. intermedia</i>	69
4.3 Detecção de toxina loxoscélica em extratos de tecidos de animais submetidos a tratamento <i>in vivo</i> com veneno loxoscélico	83
5 DISCUSSÃO FINAL	88
6 CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
ANEXOS	109

1 INTRODUÇÃO

As aranhas são divididas em dois grupos principais: o Migalomorfa (aranha primitiva) e Araneomorfa (aranhas verdadeiras), as espécies mais perigosas para o homem são encontradas neste segundo grupo (RASH, HODGSON, 2002; ESCOUBAS *et al.*, 2000). Morfologicamente, as aranhas possuem o corpo dividido em dois segmentos, o cefalotórax (união entre cabeça e tórax) e o abdômen; quatro pares de patas; apresentam quelíceras; pedipalpos e podem possuir até oito olhos (RUPPERT, BARNES, 1996). A maioria dos acidentes com aranhas não apresenta repercussão clínica, apenas uma pequena porcentagem de espécies no mundo são capazes de causar problemas clínicos sistêmicos (SWANSON, VETTER, 2006). No entanto, o gênero *Loxosceles* esta incluso dentre os mais perigosos, juntamente com o grupo das Labidognathas, *Lactrodectus* (viúva negra) e *Phoneutria* (aranha de bananeira, armadeira ou macaca). Estas aranhas são responsáveis por muitos casos graves de envenenamento e registros de óbito (APPEL *et al.*, 2005; CHAIM *et al.*, 2006; SINAN, 2012).

As aranhas do gênero *Loxosceles* apresentam distribuição mundial (FUTRELL, 1992; da SILVA *et al.*, 2004). Porém, são predominantemente encontradas em regiões tropicais da América e África, (SWANSON, VETTER, 2006) devido à facilidade de se adaptar em diferentes temperaturas (8° a 43 °C) (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). Existem aproximadamente 100 espécies de aranhas *Loxosceles*, entre estas três espécies estão muito relacionadas ao desenvolvimento de dermonecrose após os acidentes: a *Loxosceles laeta* (América do Sul), *Loxosceles intermedia* (Brasil e Argentina) e *Loxosceles gaucho* (Brasil) (SWANSON, VETTER, 2006). Na região Sul do Brasil, principalmente no Paraná e Santa Catarina, as aranhas marrom (*L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*) são popularmente conhecidas e facilmente encontradas. Os acidentes com estes animais representam um grave problema de saúde pública (FELICORI *et al.*, 2006; BARBARO *et al.*, 2005; DIAS-LOPES *et al.*, 2010a). Desde 2001, os acidentes loxoscélicos ocupam o segundo lugar entre as ocorrências com animais venenosos registradas no estado do Paraná (SESA, 2012). Casos envolvendo

envenenamento humano por esses aracnídeos são facilitados pela presença destes animais no ambiente intradomiciliar dos humanos (FUTRELL, 1992; SWANSON, VETTER, 2006). A causa da invasão do habitat do homem por estas aranhas e, consequente, aumento no número de acidentes loxoscélicos, atribui-se ao desequilíbrio ambiental e ausência de predadores, fatores que aumentam gradativamente com o avanço da área urbana (FISCHER, 2005; GREMSKI *et al.*, 2010). Porém, um dos fatores responsáveis pelo alto índice de envenenamento pode ser a falta de conhecimento da população geral em relação à prevenção dos acidentes e a biologia das aranhas. Desta maneira os acidentes podem ser considerados não somente um problema relacionado com as políticas públicas na área da saúde, mas também relacionados com questões economicas de um país (FERREIRA, SOARES, 2008).

O conjunto de manifestações clínicas resultante do envenenamento por aranhas do gênero *Loxosceles* costuma ser denominado como Loxoscelismo, araquidismo necrótico ou gangrenoso (FUTRELL, 1992). O indivíduo picado por aranhas do gênero *Loxosceles* pode desenvolver somente o quadro clínico de loxoscelismo cutâneo. Em casos menos frequentes, adicionalmente, pode desenvolver o loxoscelismo sistêmico ou visceral. As características do loxoscelismo cutâneo são sinais e sintomas locais como: dor; edema; dermonecrose; “queimação” ou ardência; prurido; espalhamento gravitacional da lesão; áreas hemorrágicas e isquêmicas, caracterizando a formação da placa marmórea (lesão de 1 a 30 cm de diâmetro, circundada por halo vermelho e uma zona pálida) (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2008; DIAS-LOPES *et al.*, 2010a). Estudos anteriores observaram a evolução do loxoscelismo cutâneo, nas primeiras horas após o acidente com o veneno da aranha marrom já se iniciam os efeitos tóxicos, como o edema, hemorragia, degeneração da parede do vaso sanguíneo e intensa diapedese. Nos dias seguintes, há evolução com a presença de trombose, destruição completa dos vasos, hemorragia e a necrose do tecido (OSPEDAL *et al.*, 2002; SWANSON, VETTER, 2006; PALUDO *et al.*, 2006). O loxoscelismo sistêmico ou visceral ocorre aproximadamente em 13% dos casos, as vítimas podem apresentar um quadro clínico muito mais grave, caracterizado por trombocitopenia (resultado de coagulação intravascular disseminada), anemia hemolítica, febre, insuficiência renal aguda (SAMS *et al.*, 2001; SEZERINO *et*

al., 1998; CHAIM *et al.*, 2006). Além disso, tem sido descrito que outros órgãos podem ser alvos do efeito tóxico no envenenamento como fígado (CHRISTOFF *et al.*, 2008), coração e pulmão (DIAS-LOPES *et al.*, 2010a). O tratamento mais comum utilizado para o loxoscelismo é a combinação de terapia com soro e aplicação de corticosteroides (BARBARO *et al.*, 2005). Sugere-se também o uso de tetraciclina na terapia por ser um agente quelante, com isto diminuindo a atividade catalítica de algumas enzimas presentes nos venenos que apresentam atividade dependente de íons (GREMSKI *et al.*, 2010).

O Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos da UFPR (LMEBV-UFPR) se dedica ao estudo e caracterização do veneno dessas aranhas há mais de uma década. Diferentes toxinas presentes no veneno já foram identificadas e suas atividades estudadas. O objetivo do grupo de pesquisa é a compreensão da atividade biológica de cada componente isoladamente, possibilitando investigar possíveis aplicações biotecnológicas. Além disso, o avanço no conhecimento das moléculas que compõem o veneno permite o desenvolvimento de novas estratégias nas áreas de diagnóstico, tratamento e prevenção do loxoscelismo (CHAIM *et al.*, 2011; GREMSKI *et al.*, 2010; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). Por meio de amplos estudos, atualmente muitas toxinas já foram isoladas e caracterizadas. O presente trabalho foi desenvolvido a partir de trabalhos anteriores, onde toxinas loxoscélicas foram clonadas e expressas de forma recombinante. Neste estudo foram realizados imunoensaaios cruzados entre estas toxinas recombinantes e os soros hiperimunes produzidos contra os venenos totais das aranhas *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*. Também foram utilizados os venenos das três espécies e soros hiperimunes produzidos contra as diferentes toxinas recombinantes de *L. intermedia*. O objetivo foi estudar a conservação imunobiológica de toxinas distintas entre as diferentes espécies de interesse médico comumente encontradas no estado do Paraná (*L. intermedia*, *L. gaucho*, *L. laeta*).

1.1 Aranhas do gênero *Loxosceles*

O gênero *Loxosceles* pertence à família Sicariidae, sub-ordem Labidognatha, ordem Araneae, classe Arachnida e filo Arthropoda (PLATINIK,

2012). Apresentam um par de apêndices mastigadores ou quelíceras pontiagudas que inoculam o veneno na presa, paralisando-a. Possuem um par de pedipalpos, quatro pares de pernas ligadas ao cefalotórax e duas fiandeiras no abdômen. Sua teia característica apresenta forma irregular, descrita como tendo o aspecto de algodão esfiapado, é construída com um fio adesivo que proporciona a teia capacidade de reter presas e persistência da adesividade por longos períodos (LUCAS, 1988; EICKSTEDT, 1994; SAMS *et al.*, 2001). Segundo Futrell (1992), a característica deste gênero é o formato do cefalotórax que lembra um violino (Figura 1), essas aranhas apresentam pernas longas e delgadas em relação ao tamanho do seu corpo e podem se mover com grande velocidade. As *Loxosceles* são aranhas pequenas e possuem comprimento corporal variando de 8 a 15 mm e suas patas medem de 8 a 30 mm. Os animais desse gênero apresentam colorido uniforme que varia de marrom claro até marrom escuro, devido a esta característica são popularmente conhecidas como aranhas marrom. Podem apresentar no cefalotórax uma mancha clara (*Loxosceles gaucho*) ou uma mancha escura (*Loxosceles laeta*). A glândula de veneno é composta por duas camadas de músculo estriado, sendo uma interna e outra externa. As células epiteliais se projetam ao lúmen, que é rico em vesículas secretoras contendo veneno. Características morfológicas da glândula indicam que o veneno é uma secreção holócrina (DOS SANTOS *et al.*, 2000). Os machos diferenciam-se das fêmeas por apresentar o corpo menor e as pernas relativamente mais longas (Figura 2), mas ambos os sexos são venenosos (FUTRELL, 1992). Contudo, Oliveira e colaboradores (2005) observaram diferenças na expressão de proteínas, glicoproteínas e atividade dermonecrótica entre os venenos de aranhas machos e fêmeas, constatando uma maior toxicidade em venenos de aranhas fêmeas, principalmente na espécie de *L. laeta*.

Estas aranhas não atacam espontaneamente e não são agressivas. O envenenamento ocorre quando o animal se sente ameaçado, podendo acontecer durante atos comuns diários, como vestir-se, calçar-se, enxugar-se ou também durante o sono quando os animais são comprimidos contra a pele da vítima (FUTRELL, 1992; APPEL *et al.*, 2005). A picada é indolor e, portanto, muitas vezes o envenenamento não é notado pela vítima (DA SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005). As *Loxosceles* possuem hábitos noturnos e

costumam se esconder em lugares escuros, secos e quentes, atrás de móveis, cortinas, quadros, dentro de calçados, roupas, livros, caixas de papelão, em depósitos, quintais, garagens, porões, jardins, madeiras empilhadas, tijolos, telhas entre outros entulhos e lugares domésticos (FUTRELL, 1992; SWANSON E VETTER, 2006; SESA, 2012). Este gênero de aranhas, quando encontradas em seus esconderijos, revelam compor grandes populações. Isto ocorre devido a múltiplos fatores, tanto ambientais quanto relacionados com biologia deste aracnídeo. Alguns destes fatores já foram citados anteriormente, como a ausência de predadores; o desmatamento e o desenvolvimento acelerado da área urbana; o prolongamento do verão (época preferencial para reprodução) resultante do desequilíbrio ambiental (ANDRADE *et al.*, 1999; LUCAS, 1988); a tolerância da aranha a grandes variações de temperatura; por serem pequenas e possuírem pernas longas se escondem rapidamente em lugares de difícil acesso; vivem meses sem água ou comida (FUTRELL, 1992); demonstram preferência por presas mortas às vivas e toleram uso de inseticidas (SANDIDGE, 2003). Em condições normais na natureza podem viver por 3 a 7 anos (ANDRADE *et al.*, 2000). São predadores de pequenos animais como o tatuzinho e principalmente insetos, como formigas, pulgas, traças, e, preferencialmente, cupins (SESA, 2012).



FIGURA 1: ARANHA MARROM (*Loxosceles* sp). ADAPTADO DE: CHAVES-MOREIRA (2008).

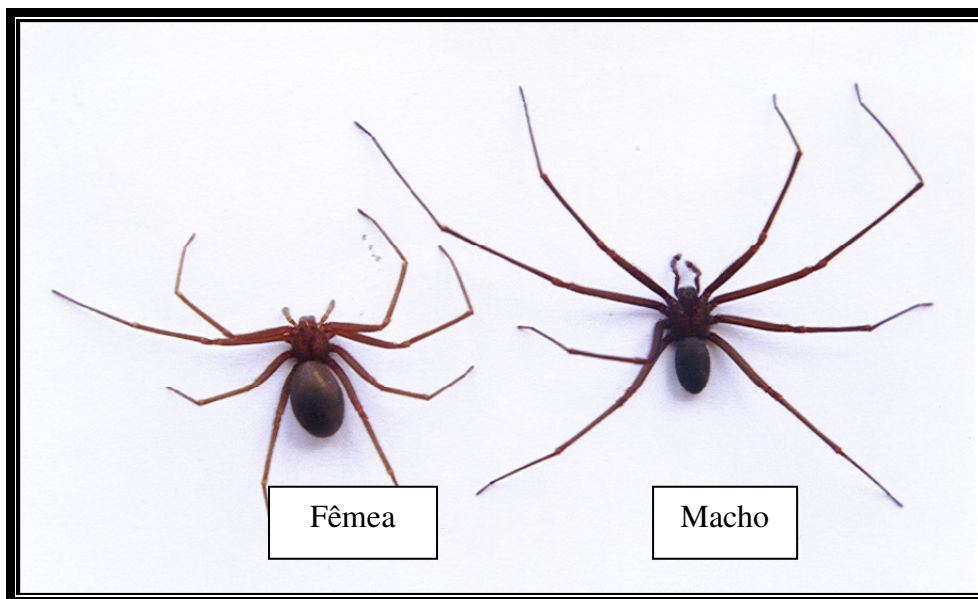


FIGURA 2: DIMORFISMO SEXUAL (*L. intermedia*). FONTE: SILVA *et al.* (2004).



FIGURA 3: COLETA DO VENENO POR ELETROCHOQUE NO CEFALOTÓRAX. ADAPTADO DE: CHAIM *et al.* (2011).

1.2 Veneno loxoscélico

O veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* é um líquido incolor e cristalino composto por uma mistura de várias toxinas proteicas que apresentam massas moleculares entre 3-40 kDa (FUTRELL, 1992; APPEL *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2007; MACHADO *et al.*, 2005). O mecanismo de ação do veneno não está completamente esclarecido, devido à complexidade de sua composição. Sabe-se atualmente que o veneno contém muitos tipos de enzimas, como lipases, proteases, hidrolases e fosfatases (FEITOSA *et al.*, 1998; FUTRELL, 1992; VEIGA *et al.*, 2001; MACHADO *et al.*, 2005). As principais toxinas que compõem o veneno loxoscélico são as fosfolipases-D (toxinas dermonecróticas), hialuronidase, metaloproteases da família das astacinas (LALP- *Loxosceles Astacin-like Protease*), proteína TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*) e peptídeos inseticidas (família das notinas - LiKp). Entre as várias toxinas descritas no veneno, as fosfolipases-D ou toxinas dermonecróticas são capazes de provocar dermonecrose; hemólise; agregação plaquetária; insuficiência renal; aumento da permeabilidade vascular e resposta inflamatória desregulada (DA SILVA *et al.*, 2004; CHAIM *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2007; MACHADO *et al.*, 2005; KUSMA *et al.*, 2008). A proteína dermonecrótica acabou recebendo uma maior atenção dos pesquisadores porque isoladamente esta toxina é capaz de provocar a maior parte dos eventos cutâneos e sistêmicos observados no loxoscelismo. Contudo, há evidências de que a toxicidade do veneno das aranhas *Loxosceles* é decorrente de efeitos deletérios sinérgicos e/ou somatórios de todos os seus componentes (DA SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005). Sendo assim, as outras toxinas presentes no veneno são também responsáveis por outros eventos importantes no envenenamento com aranhas do gênero *Loxosceles*.

As hialuronidases são conhecidas em diversos venenos como fator de espalhamento gravitacional. Esta enzima (hidrolase) é capaz de degradar constituintes da matriz extracelular e ajudar na desorganização do tecido. Atividades de degradação sobre ácido hialurônico (principal componente da matriz extracelular de vertebrados), condroitina, sulfato de condroitina e dermatam sulfato já foram descritas (DA SILVEIRA *et al.*, 2007a; GREMSKI *et al.*, 2010; FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2008). A presença de atividade hialuronidásica potencializa a ação de outros componentes do veneno, pois facilita a penetração destes em diferentes tecidos até a circulação sanguínea

(FERRER, 2010; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). Esta toxina encontra-se distribuída amplamente em todo reino animal, faz parte da composição de venenos de outros organismos como serpentes, escorpiões, vespas e abelhas (CHAIM *et al.*, 2011). Em uma avaliação envolvendo os venenos de cinco espécies de *Loxosceles* (*L. gauchoi*, *L. intermedia*, *L. laeta*, *L. reclusa* e *L. deserta*), realizada por Barbaro e colaboradores (2005) foi detectada a presença de uma enzima capaz de degradar ácido hialurônico, com massa molecular de aproximadamente 44 kDa em todos os venenos. No veneno de *L. intermedia* foram descritas duas hialuronidasas, com massas moleculares de 41 a 43 kDa (DA SILVEIRA *et al.*, 2007a; DA SILVA *et al.*, 2004; GREMSKI *et al.*, 2010).

O veneno de *L. intermedia* tem uma gama de proteases já descritas: Loxolisina A (20-28 kDa), com atividade fibronectinolítica e fibrinogenolítica; Loxolisina B (32-35 kDa), com atividade gelatinolítica (FEITOSA *et al.*, 1998; APPEL, *et al.*, 2005) e uma serinoprotease (85 kDa), com atividade gelatinolítica (VEIGA *et al.*, 2000; APPEL *et al.*, 2005). Foi relatada também a presença de toxinas metaloproteásicas da família das astacinas no veneno da *L. intermedia* (LALP1), como também em venenos de outras espécies de *Loxosceles* *L. laeta*, *L. reclusa*, *L. deserta* e *L. rufescens* (DA SILVEIRA *et al.*, 2007b; TREVISAN-SILVA *et al.*, 2010; BARBARO *et al.*, 2005; FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2008). Trevisan-Silva e colaboradores (2010) usaram uma biblioteca de cDNA do veneno de *L. intermedia* e clonaram dois novos cDNAs, codificando toxinas metaloproteases da família das astacinas (LALP2 e LALP3), além de identificar novas isoformas de astacinas nos venenos de *L. laeta* e *L. gauchoi* (LALP4 e LALP5, respectivamente). Estes resultados apontam para existência de uma família de metaloproteases do tipo astacinas em *L. intermedia* e, provavelmente, em todo gênero *Loxosceles*.

A biblioteca de cDNA da glândula de veneno de *Loxosceles intermedia* produzida pelo grupo do LMEBV possibilitou a identificação da sequência de mais uma toxina. Esta sequência codifica uma proteína da superfamília TCTP (**T**ranslationally **C**ontrolled **T**umor **P**rotein). Este nome tem origem na primeira proteína da família que foi identificada em um carcinoma humano. A superfamília TCTP é composta por proteínas de baixa massa molecular (aproximadamente 20 kDa), altamente conservadas e presentes em muitos

organismos eucarióticos (SADE *et al.*, 2012). A TCTP é uma proteína multifuncional envolvida em diversos processos fisiológicos e patológicos, estudos descrevem diferentes atividades biológicas para TCTP (BOMMER, THIELE, 2004; SADE *et al.*, 2012). A TCTP identificada na saliva do carrapato *Dermacentor variabilis* apresenta atividade de liberação de histamina em linhagem celular basofílica RBL-2H3, a qual é utilizada como modelo de estudo de vias de sinalização em mastócitos (SADE, 2009; MULENGA *et al.*, 2003). Sabe-se que proteínas desta família, quando fora da célula, são capazes de liberar histamina. A histamina e seus receptores desempenham um papel na formação de edema e o aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação, efeitos também verificados no loxoscelismo (CHAIM *et al.*, 2011). Outros estudos mostraram sua relação com o controle traducional, em linhagens tumorais, e a sua participação na tumorigênese e desenvolvimento tumoral (TELERMAN, AMSON, 2009). A TCTP de *L. intermedia* clonada e expressa de forma recombinante apresentou atividade edematogênica e de aumento da permeabilidade vascular *in vivo* (SADE *et al.*, 2012). Contudo, até o presente não se sabe ao certo o papel desta proteína no veneno da aranha marrom *L. intermedia*, sugere-se que esta toxina esteja relacionada aos efeitos dependentes da liberação de histamina do loxoscelismo (SADE *et al.*, 2012).

Castro e colaboradores (2004) descreveram no veneno de *L. intermedia*, pela primeira vez na literatura, a presença de peptídeos de baixa massa molecular (5,6 a 7,9 kDa) pertencentes a família de notinas (LiTx1, LiTx2 e LiTx3). Recentemente, Matsubara (2011) realizou a clonagem e expressão de um peptídeo desta família presente no veneno de *L. intermedia*, denominado LiKp (*Loxosceles intermedia* **K**notting **P**eptide). As notinas podem interagir com canais iônicos e receptores específicos presentes nas junções neuromusculares e ou sinapses do sistema nervoso central de insetos, causando paralisia (DE LIMA *et al.*, 2007; GREMSKI *et al.*, 2010; MATSUBARA, 2011). O provável papel destes peptídeos no veneno loxoscélico atraiu a atenção do grupo do LMEBV para possíveis aplicações biotecnológicas, como o desenvolvimento de bioinseticidas para o controle de pragas de interesse econômico (CASTRO *et al.*, 2004; MATSUBARA, 2011).

O atual conhecimento sobre quais toxinas compõe o veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* e quais são as principais toxinas envolvidas no conjunto

de sinais e sintomas clínicos do envenenamento é resultado de muitos estudos, mas, principalmente, do desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas de biologia molecular (RIBEIRO *et al.*, 2007). O estudo das toxinas do veneno de *Loxosceles* é particularmente difícil, o volume total obtido na coleta de veneno, com o auxílio de eletroestimulação (Figura 3), é limitado, poucos microlitros que contem cerca de 60 microgramas de proteínas ou menos (SAMS *et al.*, 2001; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). Portanto, as técnicas moleculares possibilitaram a obtenção de toxinas recombinantes, que isoladamente são grandes ferramentas para diferentes investigações científicas, tais como: definição da estrutura biológica; atividade catalítica; mecanismo de ação; similariedade com outras toxinas; entre outras.

A toxina fosfolipase-D era conhecida anteriormente como esfingomielinase-D, devido à capacidade de hidrolisar esfingomielina, gerando como subproduto a ceramida-1-fosfato (FUTRELL, 1992). Entretanto em 2005, LEE e LYNCH sugeriram que fosfolipase-D era a denominação mais adequada para estas enzimas, visto que estas apresentam adicionalmente a capacidade de catalisar a hidrólise de vários tipos de fosfolipídios (lisofosfolipídios, lisofosfatidilinositol, lisofosfatidilglicerol, ácido lisofosfatídico e ácido fosfatídico cíclico) gerando o ácido lisofosfatídico (LPA). Os subprodutos gerados destas reações de hidrólises são as prováveis moléculas chaves para o surgimento de algumas alterações fisiopatológicas conhecidas no loxoscelismo. Tais como: a resposta inflamatória, a agregação plaquetária, e o aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos; pois se sabe que metabólitos lipídicos são moléculas bioativas que participam de diversas vias de sinalização (CHAIM *et al.*, 2011; LEE E LYNCH, 2005).

Por meio de técnicas de biologia molecular foi demonstrado que as toxinas dermonecróticas (fosfolipases-D) constituem uma família de moléculas com grande identidade e massas moleculares semelhantes (média de 30 a 33 kDa). Atualmente, estas toxinas são as mais bem conhecidas e estudadas toxinas loxoscélicas. Alguns autores nomearam o conjunto das diferentes isoformas como proteínas Loxtox (KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007). Isoformas da toxina fosfolipase-D foram descritas e identificadas em várias espécies de *Loxosceles* (MACHADO *et al.*, 2005; FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2002). Contudo, um dos primeiros estudos que evidenciaram a existência de mais

formas ativas de fosfolipase-D em um mesmo veneno foi com veneno de *L. reclusa*, onde relataram a existência de quatro isoformas de toxinas fosfolipases-D, com alta identidade aminoacídica e que apresentavam reatividade imunológica cruzada (FUTRELL, 1992; RIBEIRO *et al.*, 2007). A primeira descrição da clonagem e expressão de uma proteína recombinante a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno de *L. laeta* foi de Fernandes-Pedrosa e colaboradores (2002). Posteriormente, duas toxinas relacionadas presentes no veneno de *L. gaucho* foram capazes de induzir dermonecrose em coelhos, nomeadas como loxnecrogin A e B, suas sequências parciais mostraram ser similares com a proteína dermonecrotica (CUNHA *et al.*, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2007; MACHADO *et al.*, 2005). Utilizando técnicas de eletroforese bidimensional, espectrometria de massa e sequenciamento de peptídeos, estudos do veneno de *L. gaucho* encontraram pelo menos onze toxinas com elevada percentagem de identidade com toxinas dermonecroticas de *Loxosceles*, previamente descritas (MACHADO *et al.*, 2005, RIBEIRO *et al.*, 2007). Além disso, na análise dos proteomas de venenos de *L. gaucho*, *L. laeta* e *L. intermedia*, realizada por Machado e colaboradores (2005) foram observadas regiões principais que apresentavam vários pontos correspondentes a proteínas com massas moleculares de 30-35 kDa. Proteínas presentes nos venenos com massas moleculares semelhantes foram descritas como proteínas dermonecroticas (MACHADO *et al.*, 2005). Uma biblioteca de cDNA da glândula do veneno de *L. intermedia* possibilitou a clonagem e expressão de diferentes isoformas de fosfolipase-D (KALAPOTHAKIS *et al.*, 2002; CHAIM *et al.*, 2006; DA SILVEIRA *et al.*, 2006, 2007c; APPEL *et al.*, 2008). Em 2006, Chaim e colaboradores clonaram e expressaram uma proteína recombinante ativa presente no veneno de *L. intermedia* (LiRcDT1). Ensaio *in vivo* e *in vitro* mostraram que esta proteína foi capaz de desencadear eventos fisiológicos observados no loxoscelismo cutâneo e sistêmico. Em seguida descreveram a clonagem, expressão, purificação e avaliação funcional de duas novas isoformas ativas da toxina dermonecrotica de *L. intermedia* (LiRecDT2 e LiRecDT3). Adicionalmente, verificou-se a reatividade cruzada destas duas novas isoformas com a LiRcDT1, identificada por Chaim e colaboradores (2006). Observou-se que ambas as proteínas recombinantes apresentavam epítomos conservados (DA SILVEIRA *et al.*,

2006). Posteriormente, outras duas isoformas também foram obtidas (LiRecDT4 e LiRecDT5) (DA SILVEIRA *et al.*, 2007c). E ainda Appel e colaboradores (2008) clonaram, expressaram e purificaram uma sexta forma ativa (LiRecDT6), esta isoforma também foi capaz de ocasionar efeitos característicos da fosfolipase-D. Por fim, uma sétima isoforma de *L. intermedia* foi recentemente clonada (VUITIKA, 2012).

Diferentes isoformas de proteínas dermonecróticas podem estar contidas no veneno como resultado da adaptação durante a evolução das espécies, o conjunto de diferentes isoformas proporciona a sobrevivência de cada espécie de acordo com o local e as condições ambientais em que se encontram as aranhas (MACHADO *et al.*, 2005). É de extrema importância a investigação das diferenças entre isoformas, obter o conhecimento de como isto pode refletir no efeito do veneno e nas respostas imunológicas. Machado e colaboradores (2005) observaram algumas diferenças em relação ao pI (ponto isoelétrico) da maioria das proteínas detectadas para cada veneno. O grupo de proteínas no veneno de *L. gaucha* apresentou pI 4-9, no veneno de *L. intermedia* a maioria de pontos se encontravam entre 6-10, algumas mais intensas estavam concentradas em um pI neutro. Para o veneno de *L. laeta* o maior grupo de proteínas se localizou na faixa referente a pI ácido (MACHADO *et al.*, 2005). Diferenças na toxicidade dos venenos das espécies foram relatadas por Barbaro e colaboradores (1996). Neste estudo foi mostrado através do ensaio de DL₅₀ em camundongos, que o veneno de *L. intermedia* é mais letal do que o veneno de *L. laeta* e *L. gaucha*, porém diferenças relacionadas a atividade dermonecrotica não foram observadas. Com a análise deste resultados, é possível perceber a presença de componentes no veneno que não estão apenas envolvidos com a atividade dermonecrotica, e provavelmente em uma quantidade maior em veneno de *L. intermedia* (GREMSKI *et al.*, 2010). Nos últimos anos, os transcriptomas de *L. laeta* e, posteriormente, de *L. intermedia* foram publicados. Fernandes-Pedrosa e colaboradores (2008) com o objetivo de investigar a complexidade molecular do veneno de *L. laeta* realizaram análise do transcriptoma da glândula produtora de veneno. Obtiveram a predominância de clones de fosfolipases-D (16,3% das sequências presentes na glândula de veneno) no grupo nomeado como “toxinas conhecidas”. Verificaram também a presença de transcritos com

similariedade para metaloproteases, neurotoxinas, hialuronidases (8,2%, 0,2%, 0,13%, respectivamente, do total de sequências). Foram encontrados também outros transcritos similares a sequências depositadas em Gen Bank, tais como serinoproteases, lectina tipo C, inibidores enzimáticos entre outros. Recentemente, Gremski e colaboradores (2010) realizaram uma análise do transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia*, os dados obtidos revelaram diferenças significativas em relação a perfis de outras aranhas do gênero *Loxosceles*. Através dos dados obtidos da análise de similariedade, foi possível observar que 43,5% do total de transcritos codificam toxinas. Os peptídeos inseticidas associados estruturalmente as notinas (LiTx) perfazem aproximadamente 23% sobre o total de transcritos, representando a maior parte do grupo de toxinas expressas na glândula do veneno de *Loxosceles intermedia*. Os transcritos codificantes para fosfolipases-D e metaloproteases do tipo astacina totalizam 9% para cada toxina do total de transcritos. Visto em trabalhos anteriores, peptídeos de baixa massa molecular estão presentes em ambas as espécies (*L. intermedia* e *L. laeta*) em concentrações diferentes, porém nenhum dos peptídeos descritos no veneno de *L. intermedia* foi descrito para o veneno de *L. laeta* (BARBARO *et al.*, 1996; FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2008; GREMSKI *et al.*, 2010). As diferenças verificadas na representatividade da fosfolipase-D, quando estes dois transcriptomas são analisados comparativamente podem ser atribuídas ao fato do transcriptoma de *L. laeta* ter sido realizado somente com aranhas fêmeas, enquanto, o de *L. intermedia* utilizou aranhas de ambos os sexos. Anteriormente, foi visto que o veneno de *L. intermedia* fêmea apresenta maior concentração de fosfolipase-D comparado com o macho (GREMSKI *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 1999).

Neste trabalho a conservação biológica das toxinas recombinantes de *L. intermedia*, LALP1 (metaloprotease do tipo astacina), hialuronidase, LiKp e TCTP, e as isoformas de fosfolipases-D LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3, LiRecDT5 e LiRecDT6, foram avaliadas por meio de imunoensaios. Nestes estudos foram utilizados anticorpos produzidos contra estas toxinas recombinantes e contra os venenos totais das três espécies de *Loxosceles* de importância médica no Brasil (*L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*).

1.3 O uso de anticorpos como bioferramentas

Anticorpos ou imunoglobulinas são glicoproteínas produzidas por um organismo em resposta à presença de moléculas estranhas no corpo. São responsáveis pelo reconhecimento de antígenos, papel fundamental para o adequado desenvolvimento da resposta imune de organismos vertebrados. Os anticorpos são sintetizados principalmente por células do plasma e diferenciados por células da linhagem de linfócitos B (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012; JANEWAY *et al.*, 2007). A imunoglobulina G é a principal classe de molécula de anticorpo e é uma das mais abundantes no soro. As imunoglobulinas G são formadas por duas cadeias leves e duas cadeias pesadas, ligadas entre si por pontes dissulfeto. Cada cadeia pode ser dividida em regiões constantes e variáveis (LEHNINGER, NELSON, COX, 2011; ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012). São moléculas grandes, com peso molecular de aproximadamente 150 kDa (cadeia pesada aproximadamente 50kDa e cadeia leve 25 kDa) (JANEWAY *et al.*, 2007) A ligação antígeno-anticorpo apesar de não-covalente é forte e, em geral, bastante específica. Esta forte interação é gerada por pontes de hidrogênio, ligações eletrostáticas, forças de Van der Waals e hidrofóbicas (ROITT *et al.*, 2006).

Os determinantes antigênicos ou epítomos podem ser: conformacionais (descontínuos) e ou lineares (contínuos). Os epítomos conformacionais são estruturas reconhecidas compostas por segmentos proteicos descontínuos na sequência de aminoácidos do antígeno, mas contínuos na estrutura tridimensional. O epítomos lineares são compostos por fragmentos únicos da cadeia polipeptídica, podem ser acessíveis aos anticorpos em uma proteína nativa dobrada, mas frequentemente, os determinantes lineares podem ser inacessíveis na conformação nativa e surgir apenas quando a proteína é desnaturada (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012). A maioria dos anticorpos gerados contra proteínas nativas reconhece epítomos descontínuos, devido ao processo de geração de determinantes antigênicos pelas células B específicas a partir do antígeno, este evento acontece na resposta humoral aos antígenos proteicos (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012; JANEWAY *et al.*, 2007; CROWTHER, 2001).

Anticorpos gerados em uma resposta imune natural ou após imunização em laboratório são uma mistura de moléculas de diferentes especificidades e afinidades, estes anticorpos são chamados de policlonais. Estes anticorpos são um conjunto de moléculas que se ligam a diferentes epítomos de um mesmo antígeno imunizante (JANEWAY *et al.*, 2007). O antissoro é o produto da resposta de muitos clones de células e é, geralmente, heterogênea em todos os níveis (especificidade, classe, subclasses, título e afinidade). A afinidade refere-se à energia entre um único epítomo e paratopo (parte da molécula de anticorpo que se liga ao epítomo). Então, antissoros de múltiplas especificidades (específicos para muitos determinantes em um antígeno) não podem ser avaliados por afinidade, porém, podem ser avaliados pela energia total de ligação (avidez) com um antígeno em qualquer ensaio escolhido. A soma de todas as afinidades individuais de uma população de anticorpos, ligantes de diferentes sítios antigênicos é representada pela avidez (CROWTHER, 2001).

O conjunto de características dos anticorpos policlonais os torna ferramentas insubstituíveis para diversas finalidades biológicas e biomédicas. Anticorpos policlonais apresentam diferentes vantagens, tais como, amplificação do sinal da proteína alvo que possui baixo nível de expressão (em imunoensaios); tolerância a pequenas alterações no antígeno (leve desnaturação); detecção de proteínas desnaturadas (ótimo reconhecimento); obtenção de baixo custo (HARLOW E LANE, 1988; CROWTHER, 2001). Entretanto, possuem certas desvantagens intrínsecas relacionadas à heterogeneidade dos anticorpos que contêm. Mesmo anticorpos purificados podem incluir subpopulações de anticorpos que proporcionam reações cruzadas, que podem ampliar a análise do resultado dependendo do objetivo do experimento. Para determinados tipos de estudo é recomendada a utilização de anticorpos monoclonais, que são resultado de engenharia genética, onde se realiza a fusão de células esplênicas de um camundongo com células tumorais, gerando células híbridas. Todas as moléculas de anticorpos produzidas por estes hibridomas são idênticas em estrutura, inclusive nos seus sítios de ligação de antígenos (JANEWAY, 2007).

Quando a imunização é realizada por uma mistura de antígenos, como o veneno total de um animal, o resultado é a produção de diversos anticorpos

contra os vários antígenos presentes na mistura injetada no animal submetido à imunização. Um veneno total é composto por diferentes proteínas, cada uma apresenta a sua antigenicidade intrínseca (capacidade de provocar a formação de anticorpos), o que também contribui para a produção de uma população diversificada de anticorpos (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012).

A hiperimunização se refere ao protocolo de injeções nos animais, com intervalos de tempos específicos. A produção de anticorpos é estimulada, repetidamente no animal, com a utilização de um mesmo antígeno. A escolha do animal para imunização é determinada basicamente por quatro perguntas: 1) quanto de soro (anticorpos) é necessário; 2) de qual espécie é o antígeno de interesse isolado; 3) anticorpos monoclonais são necessários; e 4) quanto antígeno de interesse há disponível. Coelhos podem produzir até 500 ml de amostra de soro e são considerados o melhor modelo para a produção de anticorpos policlonais, mesmo quando a quantidade de antígeno é limitada. Camundongos produzem no máximo 2 ml de soro e são a melhor escolha para anticorpos monoclonais, pois possuem genética excelente de resposta imune, ou seja, o sistema imune de camundongos responde muito bem a um antígeno específico (HARLOW E LANE , 1988).

O desenvolvimento de anticorpos para utilização na terapêutica em casos de envenenamento, teve início no fim do século XIX (OLVERA *et al.*, 2006). No início, utilizava-se apenas o antissoro total obtido por imunizações de animais, posteriormente, desenvolveram-se técnicas de purificação para obtenção da fração do soro referente às imunoglobulinas somente. Assim, descartando as demais proteínas presentes no soro que poderiam ser responsáveis por efeitos indesejáveis em pacientes. Existem técnicas que clivam os anticorpos por meio de enzimas específicas, produzindo fragmentos ou domínios divalentes que aumentam a capacidade de neutralização do antissoro e ou a sensibilidade dos imunoensaios (OLVERA *et al.*, 2006; GOMEZ *et al.*, 1999; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI *et al.*, 1998). A primeira utilização do veneno bruto de *Loxosceles* em termos de biotecnologia foi visando a produção de soros hiperimunes para utilização como antissoro no tratamento do loxoscelismo, devido à necessidade de tratamento das vítimas da picada de aranha-marrom (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). No Instituto Butantan (São Paulo, Brasil), soros anti-aracnídeos são produzidos pela imunização de

cavalos com um pool de venenos de *L. gauchoi*, *Phoneutria nigriventer*, *Tityus serrulatus* e *T. bahiensis* (BARBARO *et al.*, 1994, 1996; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). No Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI), no estado do Paraná, o soro anti-aracnídeo produzido é específico para o gênero *Loxosceles*, na produção deste soro são utilizados os venenos de *L. intermedia*, *L. gauchoi* e *L. laeta* (DA SILVA *et al.*, 2004; PAULI *et al.*, 2009; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). Os anti-venenos utilizados comercialmente (soro antiaracnídeo e soro poliespecífico anti-veneno de *Loxosceles*) foram avaliados quanto à capacidade de neutralização de proteínas de cinco espécies de *Loxosceles* (*L. gauchoi*, *L. laeta*, *L. intermedia*, *L. reclusa* e *L. deserta*). Os resultados mostraram que os anti-venenos comerciais foram eficientes para todas as espécies avaliadas (BARBARO *et al.*, 2005). Em 2008, Almeida e colaboradores desenvolveram um novo soro anti-loxoscélico e compararam a sua eficácia de neutralização com o soro utilizado na terapia do loxoscelismo no Brasil. Para a produção deste soro foram utilizadas toxinas fosfolipases-D recombinantes, duas isoformas de *L. intermedia* e uma isoforma de *L. laeta*. Os resultados dos experimentos mostraram que este novo soro foi capaz de neutralizar efeitos tóxicos do veneno de maneira mais eficiente que o soro anti-aracnídeo, em envenenamentos por *L. intermedia* e *L. laeta*. Na maioria dos experimentos, o anti-aracnídeo foi mais eficiente em neutralizar os efeitos do envenenamento por *L. gauchoi*. Este estudo sugere a substituição do veneno bruto por toxinas dermonecróticas recombinantes na produção de soro para a terapia do loxoscelismo. Com o objetivo de obter maior conhecimento sobre eficácia de utilização do soro produzido pelo CPPI, o tempo de utilização após envenenamento experimental foi avaliado por Pauli e colaboradores (2009). Deste modo, o tempo limite no qual o soro ainda apresenta a capacidade de ação na terapêutica do loxoscelismo foi avaliado. Os resultados indicam que quando os anti-venenos de *Loxosceles* são aplicados até 48h após o envenenamento, pode-se diminuir a área de dermonecrose; e quando aplicado 12h após o acidente é possível minimizar os efeitos subcutâneos e sistêmicos do veneno.

A investigação de epítomos presentes na estrutura de uma proteína é uma excelente estratégia para a produção de soros e vacinas. Possibilitando desta maneira o desenvolvimento de imunobiológicos contendo somente o

determinante antigênico com o potencial de gerar resposta imune, excluindo-se a porção da proteína responsável por efeitos tóxicos (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008).

Contudo, o uso de anticorpos produzidos para reconhecer toxinas específicas e ou venenos brutos totais não se limita a identificar e desenvolver antissoros ideais visando uma eficiente neutralização dos efeitos do envenenamento. Muitos estudos buscam detectar os epítomos responsáveis pela ligação de anticorpos, ou ainda, aprofundar o conhecimento sobre as bases moleculares que permitem a ligação antígeno-anticorpo. Outros, ainda buscam o desenvolvimento de imunodiagnósticos facéis, rápidos e específicos, com possibilidade comercial. Portanto, anticorpos policlonais e/ou monoclonais são bioferramentas científicas que permitem diferentes aplicações nas áreas científica e biomédica. Atualmente, os anticorpos são amplamente utilizados em diferentes áreas da ciência com os mais diversos objetivos de investigação.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estudar a conservação biológica de toxinas nos venenos de aranhas do gênero *Loxosceles* de interesse médico no Brasil (*L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*) por meio de imunoenaios. Para isto foram realizados os seguintes objetivos específicos:

- Expressão heteróloga e purificação da toxina recombinante LiRecDT6 de *L. intermedia*, utilizando sistema de expressão heteróloga procarioto em *E. coli*.
- Identificação de imunorreatividade entre os soros policlonais que reconhecem os venenos brutos das 3 espécies de *Loxosceles* (*L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*) e as toxinas recombinantes de *Loxosceles intermedia* (LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3, LiRecDT5, LiRecDT6, LALP, TCTP, hialuronidase e LiKp) utilizando os imunoenaios de ELISA e imunodeteção (*western-blotting*).
- Identificação de imunorreatividade entre os soros policlonais que reconhecem as toxinas recombinantes de *Loxosceles intermedia* (anti-LiRecDT1, anti-LALP, anti-TCTP, anti-hialuronidase e anti-LiKp) e os venenos brutos das 3 espécies de *Loxosceles* (*L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*), utilizando os imunoenaios de ELISA e imunodeteção (*western-blotting*).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Os sais, ácidos, bases e solventes orgânicos foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). O marcador de massa molecular para SDS-PAGE, o BSA, o ágar-ágar, o Ponceau-S, o OPD e os anticorpos secundários utilizados nos ensaios de imunodeteção e ELISA foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MI, EUA). O marcador de número de pares de bases *Gene Ruler 100 pb DNA Ladder Plus* e o IPTG foram adquiridos da empresa Fermentas (Vilnius, Lituânia). O BCIP, o NBT e o brometo de etídio foram adquiridos da Promega (Madison, WI, EUA). Os reagentes SDS, corante Azul de Coomassie, Tris e Glicina foram adquiridos da GibcoBRL (Grand Island, NY, EUA). A resina Ni-NTA agarose e a agarose foram adquiridas da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). Os reagentes para meio de cultura, tais como peptona, extrato de levedura e triptona foram adquiridos da BD (Sparks, MD, EUA). Os antibióticos foram adquiridos da USB (Cleveland, OH, EUA). O veneno de *L. intermedia* foi coletado de aranhas adultas mantidas em condições apropriadas e submetidas a eletrochoque de 15V no cefalotórax (FEITOSA *et al.*, 1998). Os venenos de *L. laeta* e *L. gaucho* utilizados na imunização foram gentilmente doados ao nosso Grupo de Pesquisa pelo CPPI (Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos).

3.2 Anticorpos

Os soros hiperimunes utilizados nos ensaios de ELISA e de imunodeteção foram produzidos anteriormente pelo nosso Laboratório (Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos da UFPR). Brevemente, para o protocolo de imunização foram utilizados coelhos adultos neo-zelandeses, que ficaram sob os cuidados do biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, com água e comida *ad libitum*. As etapas de imunização foram descritas por Meissner (2009). Os soros hiperimunes anti-LiRecDT1, anti-LALP e anti-TCTP utilizados neste trabalho foram produzidos e

armazenados seguindo protocolos estabelecidos e descritos em trabalhos anteriores (CHAIM *et al.*, 2006, TREVISAN-SILVA *et al.*, 2010, SADE *et al.*, 2012). Os soros hiperimunes anti-hialuronidase e anti-LiKp foram produzidos recentemente por Valéria P. Ferrer (comunicação pessoal, 2011) e Fernando Matsubara (MATSUBARA, 2011).

3.3 Quantificação de Proteínas

A dosagem protéica dos venenos totais das diferentes espécies de *Loxosceles* e das proteínas loxoscélicas recombinantes foi realizada como descrito por BRADFORD (1976), utilizando o corante de *Coomassie Brilliant Blue* e baseia-se na interação entre o corante e proteínas que contém aminoácidos com cadeias laterais básicas ou aromáticas. Utilizou-se reagentes do *Kit II BioRad Protein Assay* que contém soroalbumina bovina (BSA) como padrão de proteína e o Reativo de Bradford (corante, ácido fosfórico e metanol). O método foi adaptado para microensaio, sendo realizado em microplacas de 96 poços MaxiSorp (Nunc, Roskilde, Dinamarca) que permitem que a dosagem proteica seja realizada utilizando-se pequena quantidade de amostra. A concentração de proteínas é determinada por meio de uma curva padrão previamente construída para a soroalbumina bovina 0,25 µg/mL; 0,5µg/mL; 1,0 µg/mL; 1,5 µg/mL; 2,0 µg/mL, todos os pontos feitos em duplicatas (branco, curva padrão e amostra). As amostras protéicas foram submetidas a diluição seriada em água deionizada, foi colocado 20µL tanto das amostras de proteína padrão quanto das proteínas de concentração desconhecida e para a leitura do branco foi utilizado 20µL de água deionizada. O reativo de Bradford foi diluído pouco antes da leitura, conforme instruções do fabricante, e adicionou-se 200µl após incubação de 5 minutos à temperatura ambiente. As absorbâncias das reações colorimétricas foram mensuradas em leitor de ELISA (Meridiam ELX 800) com filtro 595nm programado para descontar a leitura do branco das leituras das amostras de interesse e calcular a curva a partir das concentrações da proteína padrão.

3.4 Expressão de toxina recombinante em Sistema Procarioto

3.4.1 Cepas de *E. coli* e vetores de expressão

Para o desenvolvimento deste trabalho foi realizada a expressão heteróloga da proteína recombinante LiRecDT6 a partir da construção já pronta do vetor de expressão (APPEL *et al.*, 2008). Para a expressão de proteínas recombinantes foi utilizada a cepa de *Escherichia coli*, BL21(DE3)pLysS, e o vetor de expressão pET14b, adquiridos da Invitrogen (Carlsbad, EUA) e Novagen (Darmstadt, Alemanha), respectivamente. Em um trabalho anterior realizado pelo nosso laboratório, foi construída uma biblioteca de cDNA da glândula produtora de veneno de *L. intermedia* (CHAIM *et al.*, 2006). Desta maneira, a biblioteca de cDNA proporcionou material para pesquisas posteriores, onde foi possível clonar e expressar diferentes toxinas recombinantes do veneno total de *L. intermedia*. As proteínas recombinantes utilizadas nos imunoenaios deste trabalho foram produzidas segundo protocolos de expressão já estabelecidos no Laboratório. As toxinas recombinantes utilizadas (LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3, LiRecDT5, LiRecTCTP, hialuronidase, LALP1 e LiKp já tinham sido expressas em trabalhos anteriores e encontravam-se disponíveis e armazenadas em condições adequadas (CHAIM *et al.*, 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2006 e 2007c; SADE *et al.*, 2012; FERRER, 2010; TREVISAN-SILVA *et al.* 2010; MATSUBARA, 2011). Para o desenvolvimento do presente trabalho, foi necessária apenas a expressão heteróloga da toxina LiRecDT6, realizada conforme descrito por Appel e colaboradores (2008).

3.4.2 Transformação bacteriana por eletroporação

A cepa de expressão foi submetida ao procedimento de transformação, tal método tem o objetivo de inserir o cDNAs da toxina recombinante, contido no vetor de expressão, em bactérias eletrocompetentes, as quais subsequente expressam as proteínas recombinantes de interesse. A transformação das bactérias aconteceu pela adição de 1 µL da construção em plasmídeo à 100 µL

de suspensão da cepa eletrocompetente (BL21(DE3)pLysS), em um microtubo gelado, em seguida esta solução foi homogeneizada com cuidado. A solução foi transferida para uma cubeta própria para eletroporação (1mm, 1,8V) gelada e seca, e, em seguida, foi submetida ao eletroporador (Gene Pulser X-Cell, BioRad, Hercules, CA, EUA). Imediatamente após a eletroporação, as bactérias foram colocadas em tubo de polipropileno contendo 900µl de meio SOC (triptona 20g/L; extrato de levedura 5g/L; NaCl 0,5g/L; KCl 2,5 mM; MgCl₂ 10mM; MgSO₄ 10mM; glicose 0,2M) para a recuperação sob agitação moderada por 1h a 37°C.

3.4.3 Plaqueamento das bactérias transformadas

Duas placas com meio LB-ágar (triptona 10g/L; extrato de levedura 5g/L; NaCl 10g/L; agar-ágar 15g/L) suplementado com ampicilina (100µg/mL) e cloranfenicol (34µg/mL) foram preparadas. Posteriormente, plaqueou-se 100 µl da suspensão bacteriana submetida à eletroporação em meio SOC, esta foi friccionada com o auxílio de alça de Gauss estéril até a completa absorção (secagem) do líquido em uma das placas, a outra placa recebeu os 900 µl restantes, que foram centrifugados por 3 min a 3000 rpm em temperatura ambiente e ressuspensos em 100µl de meio SOC. As placas foram incubadas a 37°C por 16h em estufa BOD (BOD 411D, Nova Ética, Campinas, Brasil) e, posteriormente, armazenadas a 4 °C.

3.4.4 PCR de colônia e eletroforese em agarose

Após a transformação da cepa bacteriana BL21(DE3)pLysS com plasmídeo pET14b contendo a sequência da toxina LiRecDT6 e plaqueamento das bactérias foi realizada uma PCR das colônias presentes na placa. Este procedimento tem por objetivo a confirmação da eficiência da transformação e escolha do clone para expressão recombinante. Nos tubos de PCR foram adicionados: Tampão *Taq* DNA polimerase (1X); dNTPs (0,2mM); MgCl₂ (1,5mM); oligonucleotídeo sense universal T7 (0,2 µM); oligonucleotídeo

universal antisense T7 *terminator* (0,2 μ M) e *Taq* DNA polimerase (1,25U/50 μ l). Esta mistura foi incubada em termociclador, para amplificação do inserto no seguinte protocolo: 95°C/5min (1ciclo); 95°C/30s – 50°C/30s – 72°C/1min (35 ciclos); 72°C/10min (1 ciclo); 4°C/ infinito. O produto do PCR de colônia foi analisado em gel de agarose 2%. Em um erlenmeyer a massa correspondente de agarose é dissolvida em tampão TAE 1x (Tris 40mM, acetato de sódio 20mM e EDTA 1mM) sob aquecimento (sem levantar fervura), e adicionou-se brometo de etídio (0,5 μ g/mL). Com o aparatato do gel previamente montado, colocou-se a solução de agarose, aguardou-se solidificar para retirar o pente e aplicar as amostras nos poços. A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal a 5V/cm e a visualização do gel foi feita em aparelho de análise de imagens Chemidoc – XRS e software *Quantity One – SW* (Bio-Rad, Hercules, EUA).

3.5 Purificação da Toxina Recombinante

3.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS – PAGE)

O perfil de integridade e pureza das toxinas recombinantes foi avaliado por meio de SDS-PAGE. O método de SDS-PAGE separa os polipeptídios pelo tamanho, portanto ele também fornece informações sobre a massa molecular e a composição das subunidades de qualquer complexo de proteínas (ALBERTS *et al.*, 2010). As eletroforeses foram realizadas com a mistura de solução de acrilamida (acrilamida e bis-acrilamida), tampão *lower* (Tris 1,5M; SDS 0,4% (p/v); pH 8,8), água destilada e os catalisadores APS e TEMED e em condições redutoras (5% de β -mercaptoetanol) como descrito por Laemmli (1970). A solução de poliacrilamida, contendo os catalisadores foi colocada num espaço de 1 mm entre duas placas de vidros fixadas e vedadas no aparato comercial Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad, Hercules, EUA). Em seguida, adicionou-se uma fina camada de isobutanol sobre a solução de poliacrilamida com objetivo de isolar a solução do ar acelerando a reação de polimerização. Após a polimerização, foi removida a camada de água proveniente da reação de polimerização e o isobutanol com o auxílio de papel filtro, colocou-se acima do gel a solução de

empacotamento (*stacking*) contendo 5% de poliacrilamida e os catalisadores, e posicionado o pente para a formação dos poços. Com a polimerização completa o pente foi retirado, os poços secados e as amostras foram aplicadas. Colocou-se parte do aparato na cuba do Kit da Bio-Rad e adicionou-se tampão de corrida 1x (tris 30,3 g/L; glicina 144 g/L; SDS 10 g/L), aplicou-se uma corrente de 25mA constante. Após a corrida eletroforética, os géis foram corados com Coomassie (Azul de Coomassie Brilhante R-250, 0,25%; metanol 50% e ácido acético 10%; em água deionizada) por 10 minutos à temperatura ambiente sob agitação constante. Para permitir a visualização da separação das proteínas descorou-se o gel com metanol 50% em água deionizada, com sucessivas trocas da solução de metanol (HARLOW; LANE, 1988).

3.5.2 Purificação por cromatografia de afinidade em Ni²⁺-NTA agarose

A proteína recombinante foi expressa como proteína de fusão, contendo um *His-Tag* N-Terminal para possibilitar a purificação. Portanto, realizou-se a purificação por cromatografia de afinidade em resina de Ni²⁺-NTA. O sobrenadante do lisado de bactérias (pré-coluna) adquirido por sonicação e/ou “French Pressure Cell Press” (“French Press”) (American Instrument Company, Maryland, United States) adicionou-se 1 mL de resina Ni²⁺ -NTA agarose e incubou-se por 1h a 4°C, nesta etapa acontece a ligação da proteína recombinante à resina. Após este período de ligação, o material foi centrifugado por 3 minutos a 2000 rpm, retirou-se o sobrenadante (*void*) com o auxílio de uma pipeta pasteur, a mistura de resina mais toxina recombinante (*pellet*) foi ressuspensa com tampão de lavagem (fosfato sódico 50mM pH 8.0, NaCl 500 mM e imidazol 20 mM), esta suspensão foi empacotada em uma coluna plástica. Em seguida, a coluna foi lavada exaustivamente com o tampão de lavagem, sendo a absorbância em 280nm monitorada durante toda a lavagem. Quando a absorbância atingiu 0,01 trocou-se o tampão de lavagem pelo tampão de eluição, este apresenta em sua composição 250 mM de imidazol (em vez de 20 mM utilizado no tampão de lavagem). Esta concentração de imidazol possibilita o desligamento da proteína recombinante de interesse da resina. As frações obtidas foram analisadas por SDS-PAGE 12,5% sob

condições redutoras para se verificar a eficiência da purificação. A proteína obtida foi dialisada contra PBS (salina tamponada com fosfato). A toxina recombinante assim purificada foi quantificada e mantida a -80°C até o momento do uso.

3.6 Imunoensaios

3.6.1 Ensaios de ELISA (Enzyme Linked Imuno Sorbent Assay)

Os imunoensaios de ELISA foram realizados com o objetivo de verificar o reconhecimento das proteínas recombinantes pelos soros policlonais hiperimunes de coelhos que reconhecem cada um dos venenos das diferentes espécies de *Loxosceles* (*L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*). Além disso, também utilizou-se esta técnica para verificar o reconhecimento de toxinas presentes nos venenos das três espécies de *Loxosceles*, utilizando soros policlonais produzidos em coelhos que reconhecem cada uma das toxinas recombinantes de *L. intermedia* (LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3, LiRecDT5, LiRecDT6; LALP1, hialuronidase, LiKp e LiRecTCTP). No ensaios de ELISA verifica-se o reconhecimento de proteínas nas suas conformações nativas, diferentemente do que acontece nas reações de imunodeteção (*western-blotting*), em que as proteínas estão em condições redutoras e, portanto, desnaturadas. Os ensaios de ELISA foram realizados em placas de 96 poços MaxiSorb (Nunc, Roskilde, Dinamarca), cada poço da placa foi sensibilizado com 100 µL de uma solução com 10 µg/mL de veneno total em PBS 1x ou de toxina recombinante, portanto, cada poço foi sensibilizado com 1 µg de proteína (2h em T.A.). O ensaio de ELISA foi realizado em pentaplicata. Após a sensibilização, os poços foram bloqueados com PBS/BSA 3% (200µl por poço) durante 16h, a temperatura de 4°C. Após a retirada do bloqueio, os poços foram lavados 5x com 200µl de PBS-TWEEN-20 0,1%. Os soros pré e hiperimunes foram diluídos em PBS/BSA 0,1%, na diluição adequada. Na etapa seguinte, pipetou-se 100µL destes soros em cada poço (anticorpos primários). Após 2h de incubação em temperatura ambiente, os poços foram lavados como descrito anteriormente, e adicionou-se 100µL de anticorpo

secundário conjugado com peroxidase (SIGMA) diluído em PBS/BSA 0,1% (diluição descrita pelo fabricante-1:8000). Utilizou-se IgG anti-imunoglobulina de coelho, conforme o anticorpo primário utilizado anteriormente. O anticorpo secundário também foi incubado por 2h em temperatura ambiente. As placas foram lavadas 5x com 200 μ L PBS-Tween 20 (0,1%) e por último lavou-se uma vez cada poço com 100 μ L de tampão citrato para peroxidase pH 5,0 (50mM de fosfato de sódio monobásico, 24mM de ácido cítrico). As reações colorimétricas foram reveladas utilizando o OPD (orto-fenil diamina), 0,2 mg/ml, com H₂O₂, 2 μ L/ml, em tampão citrato de sódio. A reação ocorreu no escuro e foi parada com 100 μ L de ácido sulfúrico 1M. A absorbância foi mensurada em 490 nm no leitor de ELISA (Meridiam ELX 800). Os ensaios com os soro pré imune foram realizados para descartar a possibilidade de reações inespecíficas por parte dos soros hiperimunes. O branco e o controle foram realizados em triplicatas, no branco não foi adicionado o anticorpo primário e, no controle, o antígeno (toxina recombinante). Os resultados obtidos frente aos ensaios de ELISA descritos neste trabalho foram concluídos após várias modificações e padronizações (dados não mostrados) e após a realização de uma triagem para a avaliação da integridade e pureza dos antissoros e das proteínas recombinantes (dados não mostrados).

Para a confecção dos gráficos que mostram os resultados dos ensaios de ELISA utilizou-se a média das absorbâncias obtidas nas pentaplicatas realizadas para cada diluição. Destes valores subtraiu-se a média das absorbâncias obtidas do controle (branco) de cada placa. Em cada placa de ELISA realizou-se além do branco (adição de todos os reagentes com exceção dos anticorpos primários), outro controle adicional (adição de todos os reagentes, com exceção do antígeno) para garantir a ausência de ligação inespecífica tanto do anticorpo primário quanto do secundário, ou seja, para garantir a qualidade do bloqueio.

3.6.2 Reações de Imunodeteção (*western blotting*)

Os ensaios de imunodeteção foram realizados para avaliar a capacidade de reconhecimento de proteínas recombinantes do veneno de *L.*

intermedia pelos soros policlonais que reconhecem os venenos totais de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*; e avaliar o reconhecimento dos venenos totais destas espécies pelos soros policlonais que reconhecem cada uma das toxinas loxoscélicas recombinantes. Para os ensaios de imunodeteção utilizaram-se amostras de proteínas recombinantes (1µg de cada uma das isoformas recombinantes de fosfolipases-D - LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3, LiRecDT5 e LiRecDT6 -; 5 µg de LALP1, 2µg de hialuronidase, , 5 µg LiKp e 5 µg LiRecTCTP) e amostras de venenos totais (20 µg ou 50µg dos venenos de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*). Amostras das proteínas recombinantes e dos venenos foram preparadas e submetidas a SDS-PAGE, separadamente, em tampão de amostra com 5% de β-mercaptoetanol, fervidas por 5 min a 100 °C e aplicadas em géis desnaturantes de poliácridamida 12,5% com gel de empacotamento (*stacking*). A corrida eletroforética foi realizada em cubas com tampão de corrida a 25 mA. Ao término da corrida, o material protéico foi transferido para membrana de nitrocelulose (Whatman, Dassel, Alemanha) com aplicação de voltagem constante (100 V) por 1,5 horas em tampão de transferência (metanol 400ml/L; 15,14g/L; 72,05 g/L). Em seguida as membranas foram coradas com Ponceau-S para verificar a eficiência da transferência e recortar as tiras, permitindo a posterior incubação com os diferentes anticorpos. As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com PBS contendo caseína (PBS-Molico) por 2 horas à temperatura ambiente. Para detecção das reações de reconhecimento imunogênico, as tiras contendo proteínas recombinantes ou venenos totais foram incubadas com soros pré-ímmunes (controle) e hiperímmunes (produzidos em coelhos), em mesma solução de bloqueio na diluição de 1:1000, por 2 horas à temperatura ambiente, sob constante agitação. Os ensaios com os soro pré-ímmune foram realizados para descartar a possibilidade de reações inespecíficas por parte dos soros hiperímmunes. Em seguida, as membranas foram lavadas 5 vezes por 3 minutos com PBS contendo caseína na ausência de anticorpo e, posteriormente, incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à fosfatase alcalina na diluição de 1:8000 por 1 hora em solução de bloqueio, à temperatura ambiente, sob constante agitação. As membranas foram lavadas 5 vezes por 3 minutos com PBS contendo caseína, 5 vezes por 3 minutos com PBS 1x e lavadas mais 1 vez por 15 minutos com tampão ótimo para fosfatase

alcalina (Tris-HCl 100mM pH 9,5; NaCl 100mM e MgCl₂ 5mM). Para revelação foi utilizado o substrato para a enzima fosfatase alcalina, o composto BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) (Promega, Madison, EUA). Após a remoção do grupamento fosfato pela enzima, o BCIP forma um dímero insolúvel na reação com composto NBT (*nitro blue tetrazolium*), (Promega, Madison, EUA) (HARLOW; LANE, 1988). Há formação de precipitado escuro onde a reação é positiva.

3.6.3 Análise estatística dos dados

As médias dos desvios padrões das absorbâncias obtidas das replicatas de todos os ensaios de ELISA realizados neste trabalho variaram de 0,003 a 0,01. As análises estatísticas foram realizadas pelo *software* Graphpad Instat. Os resultados de absorbância dos soros hiperimunes mostrados nos gráficos referentes aos ensaios de ELISA foram analisados estatisticamente frente aos resultados obtidos pelos soros pré-imunes. A partir da comparação destas médias (dos soros pré-imunes) com as obtidas para o soro hiperimune em cada diluição foi possível saber se o reconhecimento imunológico era significativo, concluindo-se, então, a existência ou não do reconhecimento das toxinas pelos soros. Os resultados foram considerados significativos para $p < 0.05$. Os resultados da análise estatística estão expostos na legenda dos gráficos de ELISA, onde a significância está especificada ($p < 0.001$; $p < 0.01$ e $p < 0.05$)

3.7 Ensaio de Imunodeteção de toxina loxoscélica em extratos de tecidos renal de animais submetidos a envenenamento experimental com veneno de *L. intermedia*

3.7.1 Tratamento dos animais

Nos ensaios *in vivo* foram utilizados camundongos suíços albinos, adultos, com peso aproximado de 30 g cada provenientes do Biotério do Setor

de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Estes animais foram mantidos com água e comida *ad libitum*, acomodados em condições de temperatura constante e luminosidade controlada. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) certificado n° 578 (em anexo). Neste experimento utilizou-se um total de três camundongos: dois camundongos (C1 e C2) foram envenenados experimentalmente com injeção intraperitoneal contendo 1mg/kg de veneno total de *L. intermedia* em 100 µl de PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCL e 16,5 mM de NaHPO₄, pH 7.4). O terceiro camundongo (C3) recebeu apenas injeção intraperitoneal contendo 100 µl de PBS 1x. Os três animais foram ortoetunasiados após 4 horas.

3.7.2 Perfusão e coleta de órgãos

A perfusão foi realizada no camundongo nomeado como C2, com o intuito de lavar os órgãos que seriam posteriormente coletados, para que a presença do antígeno fosse avaliada apenas no tecido, sem a possível interferência dos antígenos presentes na circulação sanguínea (DIAS-LOPES *et al.*, 2010). Para a realização da perfusão no animal C2 e da coleta dos órgãos nos animais sem perfusão (C1 e C3) ambos foram anestesiados com Ketamina (240 mg/kg do animal) e Xilazina (45 mg/kg do animal). As etapas de perfusão realizadas no C2 e da coleta de amostras dos órgãos nos três camundongos são brevemente descritas a seguir:

- 1- Os camundongos anestesiados foram presos a uma mesa cirúrgica de maneira que a região ventral ficasse voltada para cima. Com uma incisão ventral partindo do abdômen, os órgãos abdominais e torácicos foram expostos. As cartilagens condrocostais em ambos os lados e o esterno foram afastados, expondo dessa forma a cavidade torácica.
- 2- Com a presença ainda dos batimentos cardíacos o ventrículo esquerdo do animal (C2) é canulado e em seguida o circuito é aberto com um pequeno corte no átrio direito.

- 3- Desta forma, o camundongo foi perfundido primeiramente com heparina (140 IU) e, posteriormente, com aproximadamente 150 ml de soro fisiológico (0,9% NaCl) a 37°C, através do cateter introduzido no ventrículo esquerdo. O método aconteceu de forma satisfatória, pois após a perfusão do volume total de soro fisiológico observou-se a retirada de todo o sangue, confirmado pelo branqueamento dos órgãos (RIBEIRO, REIS-FILHO, GROTZNER, 2011).
- 4- Amostras de tecido foram obtidas dos rins e imediatamente, submersas em tampão de lise (PBS 1x, triton x-100 1%, 10mM de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), 1mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), 1mM de fenantrolina, 1µg/µl de leupeptina, pH 7,3) a 4°C em proporção de 1:2 (v/v) (amostra/tampão).

Lembrando que as etapas descritas nos itens 2 e 3 não aconteceram para os animais C1 e C3.

3.7.3 Preparação dos extratos

Para a obtenção do extrato de tecido, os rins foram triturados em pequenos pedaços para serem submetidos ao homogeneizador de tecidos manual. Após a homogeneização a 4°C, o homogeneizado foi mantido em agitador por 1h (4°C). Em seguida centrifugado (10 min/10000 rpm), e o sobrenadante dosado quanto a sua concentração protéica pelo método de Microensaio de Bradford. Posteriormente, os sobrenadantes foram congelados a – 20°C até o momento dos ensaios de imunodeteção.

3.7.4 Reações de Imunodeteção em extrato renal

O ensaio de *western-blotting* foi realizado com o objetivo de detectar a presença de epítomos da proteína dermonecrótica em extratos renais de camundongos envenenados experimentalmente com veneno total de *L. intermedia*. Para isto utilizou-se anticorpos policlonais que reconhecem a toxina LiRecDT1 na diluição de 1:1000. Amostras dos extratos renais dos

camundongos envenenados experimentalmente (C1, submetido à perfusão, e C2, não submetido à perfusão) e do camundongo controle foram preparadas, separadamente, em condições não reduzidas, ou seja, sem adição de β -mercaptoetanol. Amostras contendo 100 μ g e 50 μ g de extrato foram submetidas a uma corrida eletroforética em gel SDS-PAGE 10%. A metodologia da reação foi realizada como descrito no item 3.6.1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Expressão da proteína recombinante LiRecDT6 em sistema procarioto e purificação por cromatografia de afinidade em Ni⁺²-NTA agarose

A grande maioria das toxinas recombinantes de *Loxosceles intermedia* utilizadas na realização deste trabalho já haviam sido produzidas e purificadas anteriormente no Laboratório por outros integrantes do grupo de pesquisa. A única toxina que não estava disponível era a LiRecDT6, uma das isoformas de fosfolipase-D presentes no veneno de *Loxosceles intermedia*.

Portanto, primeiramente, esta toxina foi expressa de forma recombinante utilizando modelo procarioto. Como descrito em materiais e métodos, cepas de *E.coli*, BL21(DE3)plys-S foram transformadas com a construção pET-14b/LiRecDT6 (CHAIM *et al.*, 2006; APPEL *et al.*, 2008) e uma colônia positiva (portadora do plasmídeo contendo o inserto) selecionada. A cultura do clone selecionado foi induzida pela adição de IPTG e mantida em condições apropriadas para expressão da proteína recombinante por 3 horas. Após o processo de lise, a eficiência da expressão foi avaliada em eletroforese (SDS-PAGE). A LiRecDT6 foi purificada por cromatografia de afinidade com resina de Ni-NTA. O vetor de expressão utilizado confere uma cauda de 6 histidina na porção N-terminal da proteína recombinante, a qual se complexa com o níquel presente na resina. Após o processo de purificação a proteína foi dialisada contra solução diluída de PBS. A toxina recombinante LiRecDT6 purificada foi dosada pelo método de Bradford (1976), e a massa molecular e a pureza da proteína foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 4). Os processos de expressão heteróloga e purificação resultaram na toxina LiRecDT6 pura e solúvel. A presença da toxina LiRecDT6 na fração solúvel após a centrifugação do lisado das células bacterianas, indica que a mesma foi expressa de forma solúvel (Figura 4, coluna 3). A massa apresentada pela toxina recombinante, 33 kDa, é a massa esperada para a proteína de fusão; e a ausência de outras bandas proteicas nas amostras obtidas após a purificação (Figura 4, coluna 5) atestam a pureza da toxina. A LiRecDT6 foi expressa em condições adequadas de pureza e solubilidade para realização dos imunoenaios.

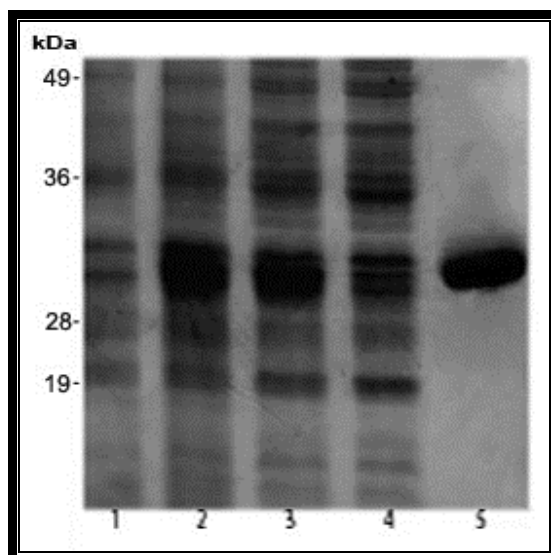


FIGURA 4: ANÁLISE DA EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA TOXINA RECOMBINANTE LIRECDT6 EM SDS-PAGE 12,5% CORADO POR COOMASSIE BLUE. Amostras de BL21(DE3)pLysS transformadas com pET-14b/LiRecDT6 antes (Coluna 1) e após (Coluna 2) a indução da proteína recombinante (T0 e T3,5h, respectivamente). Coluna 3: amostra do sobrenadante do lisado de células obtido por congelamento e passagem em “*FRENCH PRESS*” (pré-coluna). Coluna 4: amostra das proteínas que não se ligaram na resina de níquel (“*void*”). Coluna 5: amostra da toxina recombinante LiRecDT6 pura. Marcadores de massa molecular indicados à esquerda.

4.2 Ensaio de ELISA e Imunodeteção para avaliar a conservação biológica de epítopos das proteínas presentes nos venenos de *Loxosceles spp*

Primeiramente, o soro hiperimune proveniente de coelhos imunizados com o veneno total, a serem utilizados neste trabalho foram avaliados quanto à integridade e à reatividade, através ensaios de titulação de anticorpos por ELISA. Os soros que reconhecem o veneno total de *L. intermedia* foram produzidos em coelhos pelo próprio laboratório (Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos - LMEBV) em trabalhos anteriores (CHAIM *et al.*, 2006, TREVISAN-SILVA *et al.*, 2010, SADE *et al.*, 2012). Nestes ensaios de titulação dos soros, as placas foram sensibilizadas com veneno total de *L. intermedia* e os soros hiperimunes e pré-imunes foram testados nas seguintes diluições, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000, 1:32000 e 1:64000 (dados não mostrados). Não houve necessidade de realizar as titulações dos soros que reconhecem os venenos de *L. laeta* e *L. gaucho* produzidos em coelhos, pois estas tinham sido feitas recentemente por

Meissner (2009). Os ensaios de titulação confirmaram a integridade e a reatividade dos anticorpos utilizados neste trabalho.

Os imunoensaios e os resultados obtidos neste trabalho foram divididos em duas partes para fins de uma melhor apresentação e compreensão dos mesmos. Na primeira parte serão expostos e discutidos os resultados referentes ao reconhecimento de toxinas recombinantes de *L. intermedia* por soros anti-veneno das três diferentes espécies de aranha marrom selecionadas para este estudo (*L. laeta*, *L. intermedia* e *L. gaucho*). Na segunda parte, teremos os resultados e discussão referentes ao reconhecimento de toxinas nativas presentes nos venenos das três espécies por diferentes soros anti-toxina recombinante de *L. intermedia*. Tanto nos imunoensaios de ELISA quanto nos de imunodeteção (*western blotting*), utilizamos soros policlonais produzidos em coelhos. O modelo animal mais recomendado na literatura científica para a produção deste tipo de antisoro é o coelho, pois se obtêm títulos mais elevados, além de um volume maior de soro (HARLOW & LANE, 1998). Em muitos casos a imunização de camundongos não responde a todas as proteínas que compõe a variada gama dos venenos do gênero *Loxosceles*, como observado por Meissner (2009). Os soros policlonais que reconhecem cada um dos venenos loxoscélicos e ou cada uma das proteínas recombinantes foram produzidos em diferentes coelhos.

O reconhecimento imunogênico das toxinas recombinantes ou nativas foi avaliado por meio de dois tipos de imunoensaios: ELISA e imunodeteção (*immunoblotting* ou *western blotting*). Os ensaios de imunodeteção foram realizados com o objetivo de verificar o possível reconhecimento de epítomos lineares presentes nas toxinas recombinantes ou nativas. O uso de β -mercaptoetanol e do SDS nestes ensaios presentes no tampão adicionado na amostra submetida à corrida eletroforética) propicia a desnaturação e redução das pontes dissulfeto das proteínas, a fim de garantir a análise linearizada destas em gel. Diferentemente do ensaio de ELISA, que verifica a presença de epítomos conformacionais presentes na proteína recombinante ou no veneno total.

Os estudos de reconhecimento imunogênico realizados neste trabalho não apresentam como objetivo a comparação quantitativa do reconhecimento entre as toxinas e antissoros, e sim a verificação qualitativa da existência ou

não do reconhecimento das toxinas nativas e recombinantes pelos soros policlonais. Como qualquer método experimental, os métodos de avaliação utilizados neste trabalho estão sujeitos à interferentes e apresentam algumas limitações relacionadas ao próprio procedimento metodológico utilizado. Neste caso, os procedimentos experimentais não permitiriam uma análise quantitativa adequada. No ensaio de ELISA pode ocorrer a adsorção diferencial das toxinas recombinantes no poço da placa, que pode variar entre as diferentes toxinas (regiões hidrofóbicas presentes na toxina aumentam a taxa de interação com placa). E ainda os soros policlonais que reconhecem cada um dos venenos loxoscélicos foram produzidos em animais diferentes, que apresentam resposta imunológica individual e, portanto, os soros reagem de maneira individual e desigual. Desta forma, visando uma melhor avaliação do reconhecimento das toxinas recombinantes pelos soros hiperimunes produzidos contra os venenos totais das diferentes espécies de *Loxosceles* os ensaios de ELISA utilizaram diferentes diluições dos soros hiperimunes. As diluições mostradas nos gráficos a seguir foram escolhidas como as mais representativas e adequadas para cada avaliação, variando de acordo com a toxina investigada. Exemplificando, uma toxina pouco imunogênica ou pouco representativa de um veneno necessitou de uma menor diluição de antissoro para que o reconhecimento fosse constatado e avaliado de forma adequada. Tais diluições foram selecionadas após a realização de ensaios preliminares (dados não mostrados).

Na primeira etapa deste trabalho foram utilizados nos imunoensaios os soros hiperimunes anti-veneno total de *L. laeta*, *L. intermedia* e *L. gaucho*, incluindo os seus respectivos soros pré-ímmes (controles negativos). E foi avaliado o reconhecimento das toxinas recombinantes de *L. intermedia*: LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3, LiRecDT5 e LiRecDT6, LiRecTCTP, LALP1, hialuronidase e LiKp. Na segunda etapa foi avaliado o reconhecimento de toxinas nativas presentes no veneno total de *L. laeta*, *L. intermedia* e *L. gaucho* pelos soros hiperimunes que reconhecem cada uma das toxinas loxoscélicas recombinantes: anti-LiRecDT1, anti-LALP1, anti-hialuronidase, anti-LiKp e anti-LiRecTCTP.

4.2.1 Reconhecimento de toxinas recombinantes de *L. intermedia* por soros hiperimunes que reconhecem veneno total de *L. laeta*, *L. intermedia* e *L. gaucha*

Por meio dos ensaios de ELISA foi avaliada a conservação biológica de epítomos conformacionais das toxinas fosfolipases-D (LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3, LiRecDT5 e LiRecDT6), LALP1, hialuronidase, LiKp e LiRecTCTP. Diferentes diluições (1:5000, 1:15000 e 1:30000) foram utilizadas para cada soro hiperimune (anti-veneno total de *L. laeta*, *L. intermedia* e *L. gaucha*), incluindo os seus respectivos soros pré-imunes (controle negativo). Nestes imunoensaios de as amostras de fosfolipases-D recombinantes continham 1µg de proteína. Para a confecção dos gráficos dos resultados dos ensaios de ELISA utilizou-se a média das absorbâncias obtidas nas pentaplicatas realizadas para cada toxina recombinante e destes valores subtraiu-se a média dos controles (branco) de cada placa. Para as análises estatísticas dos ensaios de ELISA apresentados, os resultados de absorbância dos soros hiperimunes foram sempre confrontados com os dados de absorbância dos soros pré-imunes para verificação de significância. No ensaio de imunodeteção, as toxinas recombinantes de *L. intermedia* (1 a 5 µg) foram submetidas a SDS-PAGE, transferência para nitrocelulose e, então, foi realizado o *imunoblotting* com os antissoros. Os resultados obtidos nos ensaios de imunodeteção serão mostrados juntamente com os resultados de ELISA para cada uma das toxinas loxoscélicas recombinantes estudadas.

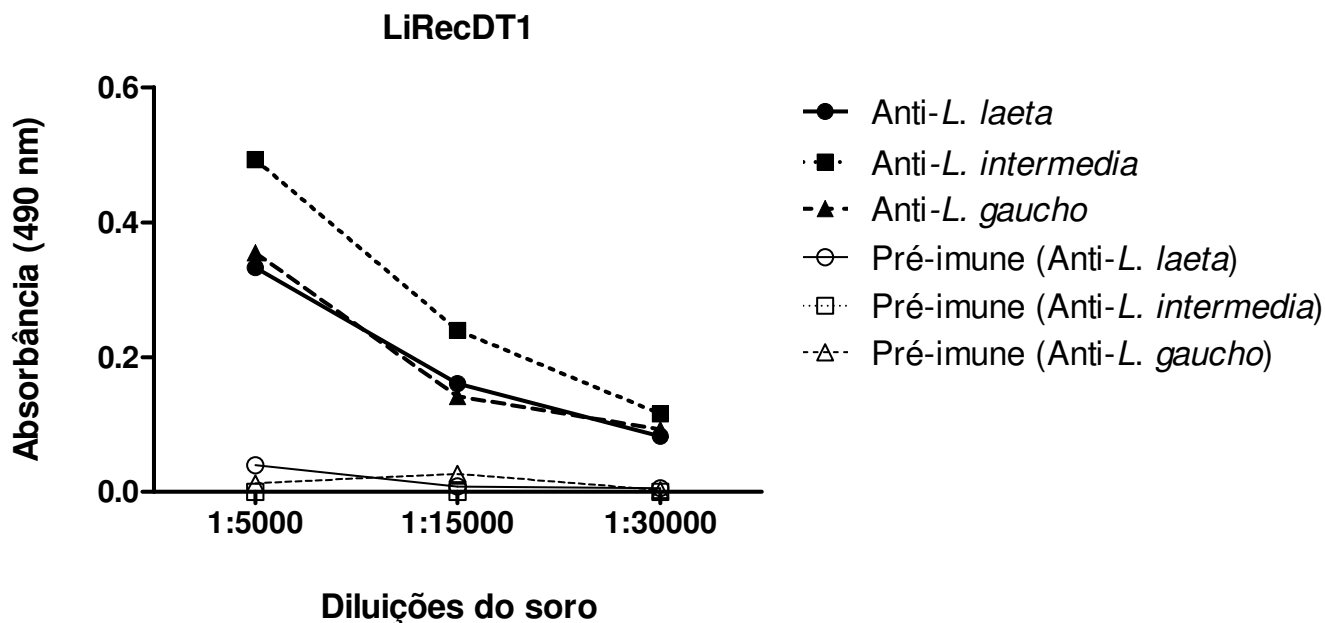


FIGURA 5: REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE LiRecDT1 E ANTI-VENENOS DE *Loxosceles spp.* - ELISA. Ensaio de ELISA realizado utilizando como antígeno 1 µg de toxina recombinante LiRecDT1/poço e como anticorpos primários soros hiperimunes anti-venenos totais de *Loxosceles spp.* em diferentes diluições (1:5000, 1:15000, 1:30000). O eixo y indica as médias das absorbâncias obtidas. As diferenças entre os resultados obtidos dos soros hiperimunes e soros pré-ímmes foram estatisticamente significativas para todas as espécies e diluições testadas, apresentando para todas as amostras $p < 0.001$.

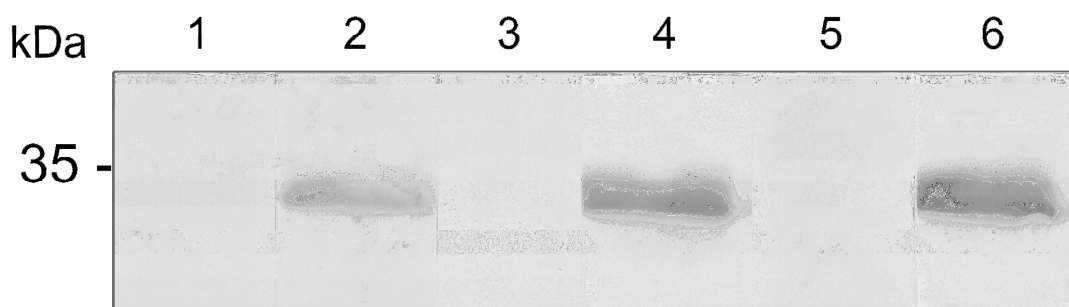


FIGURA 6: REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE LiRecDT1 E ANTI-VENENOS DE *Loxosceles spp.* - Western blotting. Imunodetecção de LiRecDT1 por soros hiperimunes anti-venenos totais de *Loxosceles spp.* Amostras de LiRecDT1 (1 µg cada amostra) foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose, após bloqueio de sítios inespecíficos, foram incubadas separadamente com soros pré e hiperimunes anti-venenos (1:1000): soro anti-*L. laeta* (coluna 1 e 2, respectivamente), anti-*L. intermedia* (coluna 3 e 4, respectivamente) e anti-*L. gaucho* (coluna 5 e 6, respectivamente). Marcador de massa molecular à esquerda.

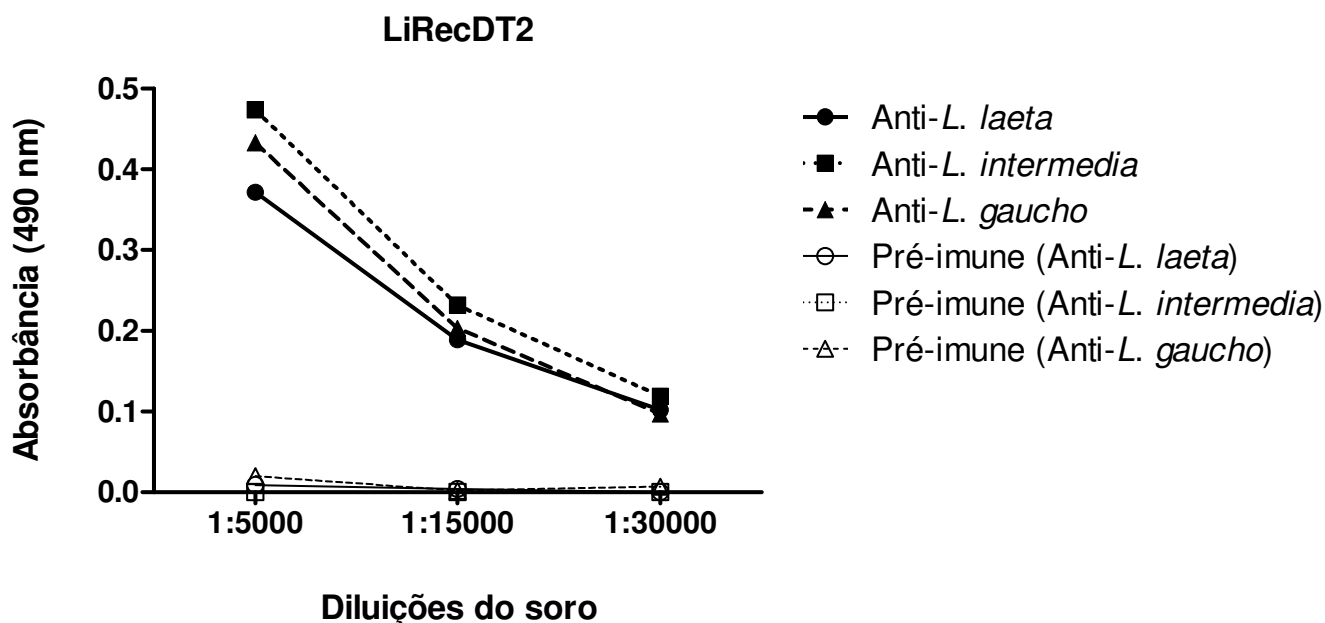


FIGURA 7: REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE LiRecDT2 E ANTI-VENENOS DE *Loxosceles* spp. – ELISA. Ensaio de ELISA realizado utilizando como antígeno 1 µg de toxina recombinante LiRecDT2/poço e como anticorpos primários soros hiperimunes anti-venenos totais de *Loxosceles* spp. em diferentes diluições (1:5000, 1:15000, 1:30000). O eixo y indica as médias das absorbâncias obtidas. As diferenças entre os resultados obtidos dos soros hiperimunes e soros pré-ímmunes foram estatisticamente significativas, apresentando para todas as amostras e diluições $p < 0.001$.

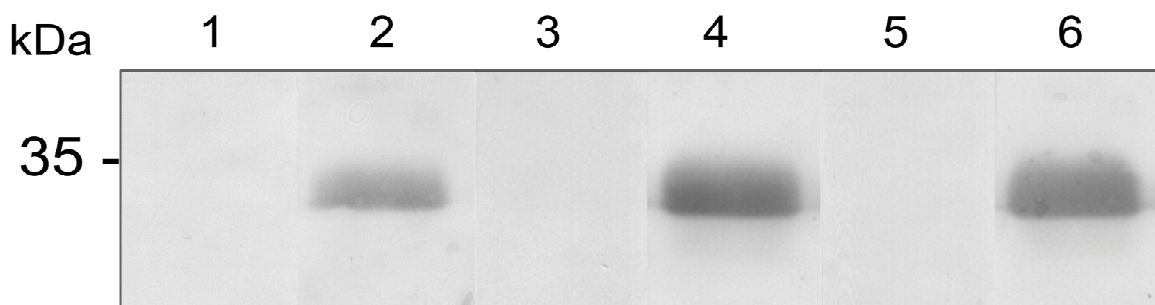


FIGURA 8: REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE LiRecDT2 E ANTI-VENENOS DE *Loxosceles* spp. – Western blotting. Imunodeteccção de LiRecDT2 por soros hiperimunes anti-venenos totais de *Loxosceles* spp. Amostras da LiRecDT2 (1 µg cada amostra) submetidas à eletroforese SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose e após bloqueio de sítios inespecíficos foram incubadas separadamente com soros pré e hiperimunes anti-venenos (1:1000): soro anti-*L. laeta* (coluna 1 e 2, respectivamente), anti-*L. intermedia* (coluna 3 e 4, respectivamente) e anti-*L. gaucho* (coluna 5 e 6, respectivamente). Marcador de massa molecular à esquerda.

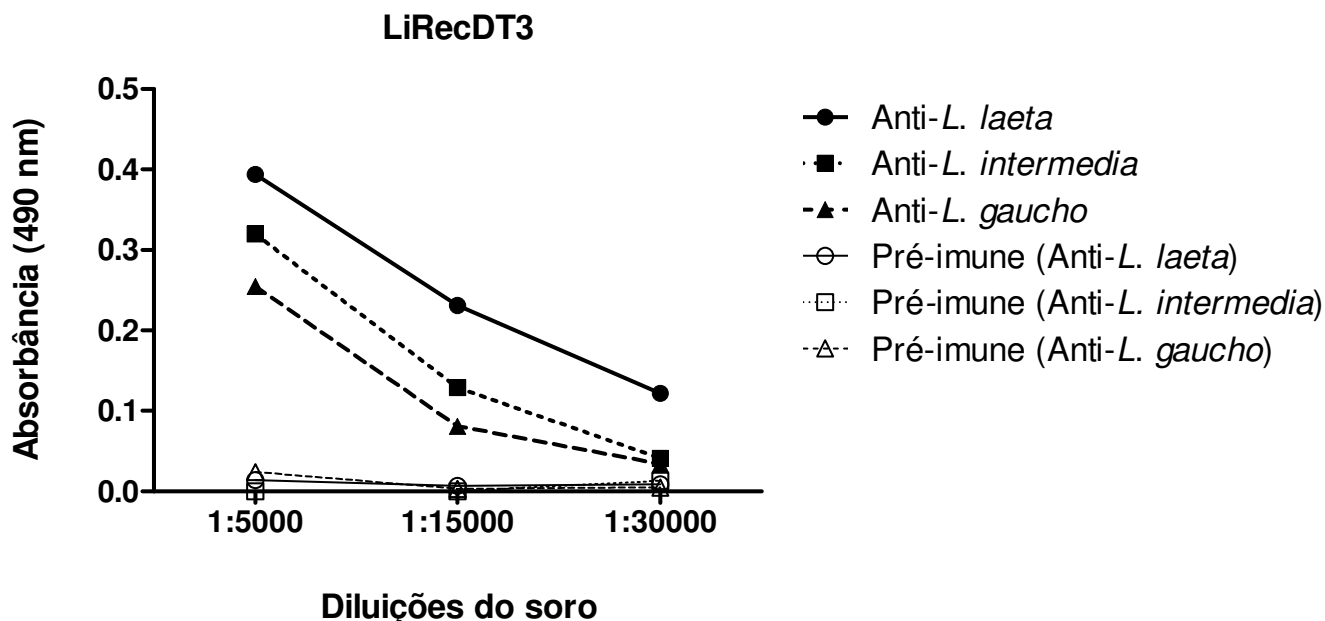


FIGURA 9: REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE LiRecDT3 E ANTI-VENENOS DE *Loxosceles* spp. – ELISA. Ensaio de ELISA realizado utilizando como antígeno 1 µg de toxina recombinante LiRecDT3/poço e como anticorpos primários soros hiperimunes anti-venenos totais de *Loxosceles* spp. em diferentes diluições (1:5000, 1:15000, 1:30000). O eixo y indica as médias das absorbâncias obtidas. A maioria das diferenças entre os resultados obtidos dos soros hiperimunes e soros pré-imunes foi estatisticamente significativa, apresentando para as amostras $p < 0.001$ e $p < 0.05$ (soro anti-*L. gaucho*, na diluição 1:30000). Com exceção da diluição 1:30000 na qual a diferença não foi significativa para o soro anti-*L. intermedia*, apresentando $p > 0.05$.

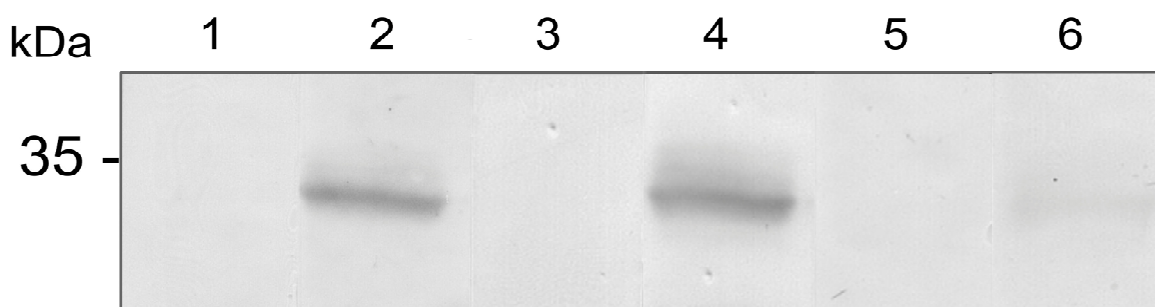


FIGURA 10: REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE LiRecDT3 E ANTI-VENENOS DE *Loxosceles* spp. – Western blotting. Imunodeteção de LiRecDT3 por soros hiperimunes anti-venenos totais de *Loxosceles* spp. Amostras da LiRecDT3 (1 µg cada amostra) após eletroforese SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose e após bloqueio de sítios inespecíficos foram incubadas separadamente com soros pré e hiperimunes anti-venenos (1:1000): soro anti-*L. laeta* (coluna 1 e 2, respectivamente), anti-*L. intermedia* (coluna 3 e 4, respectivamente) e anti-*L. gaucho* (coluna 5 e 6, respectivamente). Marcador de massa molecular à esquerda.

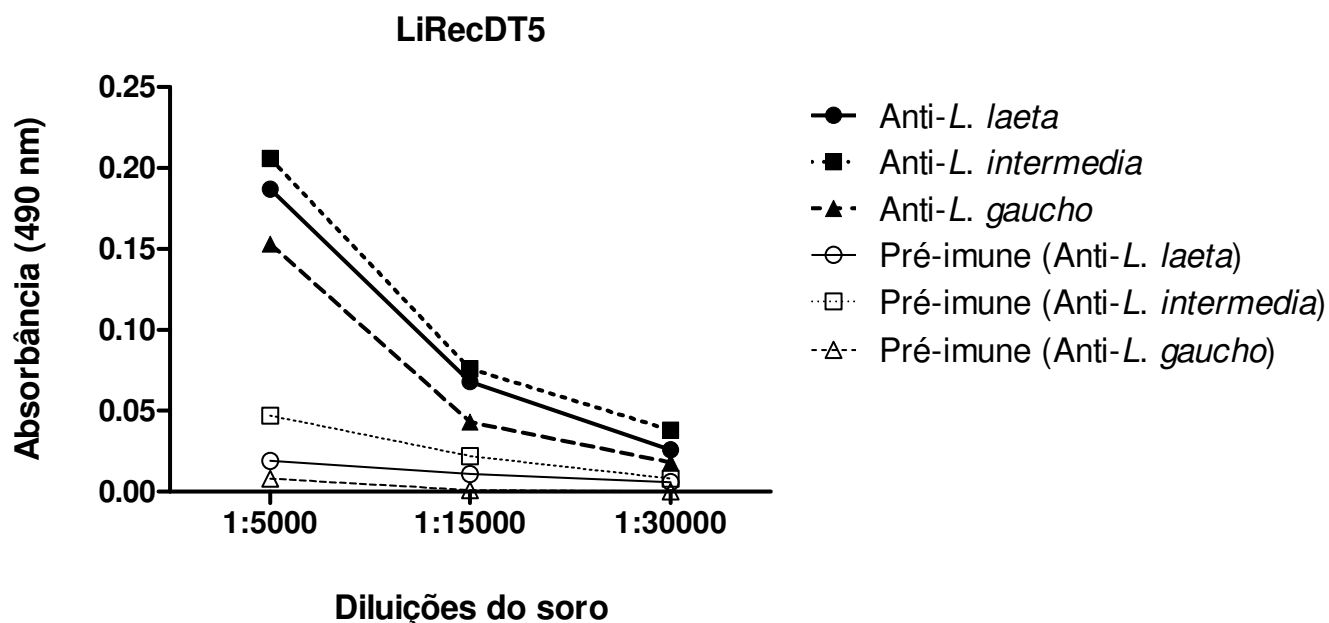


FIGURA 11: REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE LiRecDT5 E ANTI-VENENOS DE *Loxosceles spp.* – ELISA. Ensaio de ELISA realizado utilizando como antígeno 1 µg de toxina recombinante LiRecDT5/poço e como anticorpos primários soros hiperimunes anti-venenos totais de *Loxosceles spp.* em diferentes diluições (1:5000, 1:15000; 1:30000). O eixo y indica as médias das absorbâncias obtidas. As diferenças entre os resultados obtidos dos soros hiperimunes e soros pré-ímmes foram estatisticamente significativas, apresentando para quase todas as amostras $p < 0.001$, com exceção da diluição 1:30000 do soro anti-*L. laeta* que apresentou $p < 0.05$.

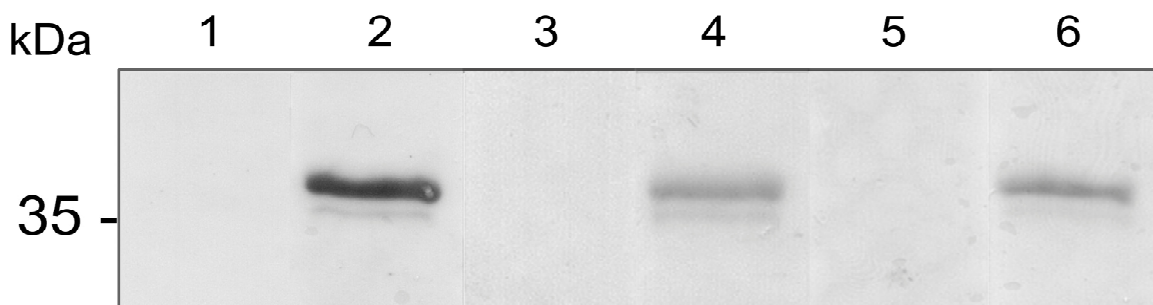


FIGURA 12: REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE LiRecDT5 E ANTI-VENENOS DE *Loxosceles spp.* – Western blotting. Imunodeteção de LiRecDT5 por soros hiperimunes anti-venenos totais de *Loxosceles spp.* Amostras da LiRecDT5 (1µg cada amostra) após eletroforese SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose, após bloqueio de sítios inespecíficos foram incubadas separadamente com soros pré e hiperimunes anti-venenos (1:1000): soro anti-*L. laeta* (coluna 1 e 2, respectivamente), anti-*L. intermedia* (coluna 3 e 4, respectivamente) e anti-*L. gaucho* (coluna 5 e 6, respectivamente). Marcador de massa molecular à esquerda.

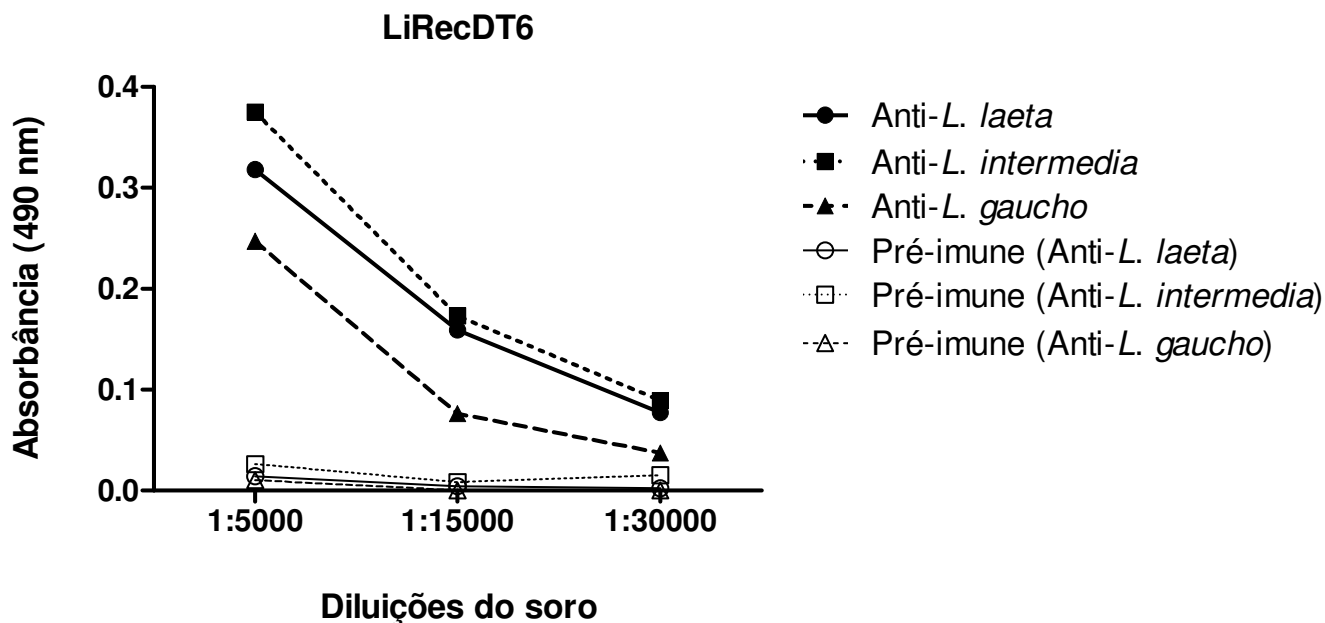


FIGURA 13: REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE LiRecDT6 E ANTI-VENENOS DE *Loxosceles* spp. – ELISA. Ensaio de ELISA realizado utilizando como antígeno 1 µg de toxina recombinante LiRecDT6/poço e como anticorpos primários soros hiperimunes anti-venenos totais de *Loxosceles* spp. em diferentes diluições (1:5000, 1:15000; 1:30000). O eixo y indica as médias das absorbâncias obtidas. As diferenças entre os resultados obtidos dos soros hiperimunes e soros pré-imunes foram estatisticamente significativas, apresentando para quase todas as amostras $p < 0.001$, com exceção do soro anti-*L. gaucho* na diluição 1:15000 que apresentou $p < 0.01$ e na diluição 1:30000 que apresentou $p < 0.05$.

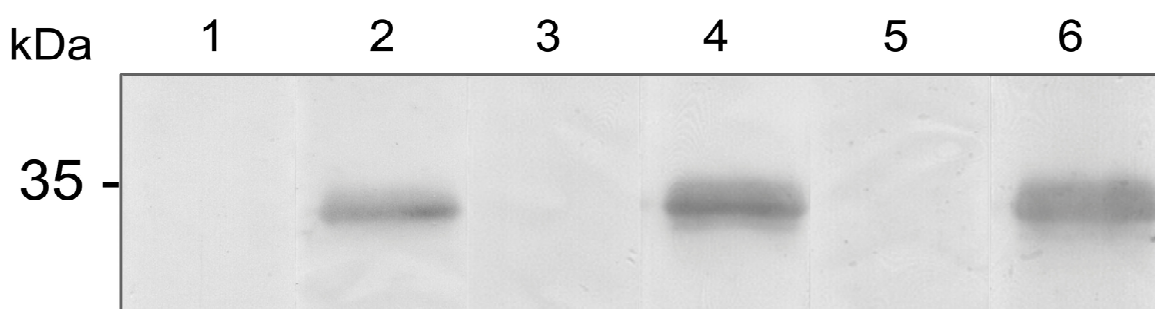


FIGURA 14: REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE LiRecDT6 E ANTI-VENENOS DE *Loxosceles* spp. - Western blotting. Imunodeteção de LiRecDT6 por soros hiperimunes anti-venenos totais de *Loxosceles* spp. Amostras da LiRecDT6 (1µg cada amostra) após eletroforese SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose. Depois do bloqueio de sítios inespecíficos foram incubadas separadamente com soros pré e hiperimunes anti-venenos (1:1000): soro anti-*L. laeta* (coluna 1 e 2, respectivamente), anti-*L. intermedia* (coluna 3 e 4, respectivamente) e anti-*L. gaucho* (coluna 5 e 6, respectivamente). Marcador de massa molecular à esquerda.

Todas as isoformas da toxina fosfolipase-D estudadas foram reconhecidas pelos soros hiperimunes das três espécies: *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*. As toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT2 foram reconhecidas em todas as diluições testadas no ensaio de ELISA pelos três diferentes soros (Figura 5 e 7). O mesmo foi observado nos ensaios de imunodeteção com diluição de 1:1000 de soro hiperimune (Figura 6 e 8). As toxina LiRecDT1 e LiRecDT2 apresentam grande similaridade da sequência aminoacídica (89%) quando suas sequências obtidas da biblioteca de cDNA são alinhadas (DA SILVEIRA *et al.*, 2006) (Anexo I). A proteína LiRecDT3 foi reconhecida pelos anti-soros das três espécies, contudo na diluição de 1:30000 no ensaio de ELISA, a proteína LiRecDT3 foi reconhecida apenas pelo soro anti-veneno de *L. intermedia* (Figura 9). No ensaio de imunodeteção observou-se reação positiva da LiRecDT3 com os três soros hiperimune testados. Porém, se observarmos a intensidade das reações de imunodeteção, o reconhecimento pelo soro anti-*L. gaucho* foi menor do que o observado para *L. intermedia* e *L. laeta*, ressaltamos contudo que nosso estudo não objetivou comparações quantitativas. Silveira e colaboradores (2006) mostraram através do alinhamento de sequências das toxinas dermonecróticas que a toxina LiRecDT2 é muito similar à toxina LiRecDT1; e que a toxina LiRecDT3 é muito similar às toxinas de *L. boneti* e *L. laeta*. Contudo, as limitações técnicas e interferências dos métodos utilizados não podem ser descartadas como responsáveis pelas diferenças observadas nos resultados. A toxina LiRecDT5 também foi reconhecida no ensaio de ELISA em todas as diluições utilizadas dos soros hiperimunes das três espécies de *Loxosceles* estudadas (Figura 11). No ensaio de imunodeteção, o precipitado da reação positiva visualizado indica o reconhecimento de LiRecDT5 por todos os soros anti-veneno testados (Figura 12). A análise da sequência de LiRecDT5, mostra uma alta similaridade com sequência de toxina dermonecrótica de *L. boneti* (DA SILVEIRA *et al.*, 2007c). Todos os soros hiperimunes analisados foram capazes de reconhecer a proteína LiRecDT6 em ambos os imunoensaios realizados e em todas as diluições testadas (Figura 13 e 14). Na análise do alinhamento das sequências aminoácidas previstas a partir dos cDNAs das isoformas de LiRecDTs, realizada por Appel e colaboradores (2008), obteve-se as seguintes porcentagens de identidades entre LiRecDT6 e as demais

isoformas de *L. intermedia*: LiRecDT6 e LiRecDT1: 64%; LiRecDT6 e LiRecDT2: 67%; LiRecDT6 e LiRecDT3: 46%; LiRecDT6 e LiRecDT5: 50% (Anexo II).

O reconhecimento das diferentes isoformas de toxina dermonecrótica de *L. intermedia* pelos soros hiperimunes que reconhecem os venenos de *L. gaucho* e *L. laeta* está de acordo com os dados da literatura que mostram a existência de uma família de fosfolipases-D nos venenos loxoscélicos (RAMOS-CERRILLO *et al.*, 2004; FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2008; GREMSKI *et al.*, 2010; MACHADO *et al.*, 2005; BARBARO *et al.*, 1996 e 2005; GOMEZ *et al.*, 2001; OLVERA *et al.*, 2006; CATALAN *et al.*, 2011; BINFORD *et al.*, 2009; KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007 e 2002). Os resultados dos imunoenaios obtidos nessa primeira etapa para as toxinas dermonecróticas, juntamente com análises anteriores realizadas em outros trabalhos, evidenciam a existência de epítomos conservados nas diferentes isoformas de toxina dermonecrótica presentes no veneno de espécies do gênero *Loxosceles*. Considerando os resultados dos ensaios e a similaridade aminoacídica entre estas isoformas de fosfolipases-D de *L. intermedia* (Anexo I e Anexo II) constata-se que tanto epítomos lineares quanto conformacionais são conservados entre estas toxinas. Este dado é ainda mais interessante quando considerados a representatividade destas toxinas no veneno (GREMSKI *et al.*, 2010) e a sua participação nos eventos deletérios do Loxoscelismo (CHAIM *et al.*, 2006 e 2011a; SILVEIRA *et al.*, 2006 e 2007c; APPEL *et al.*, 2008; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009; OLVERA *et al.*, 2006; KUSMA *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2007; FELICORI *et al.*, 2006; DIAS-LOPES *et al.*, 2010).

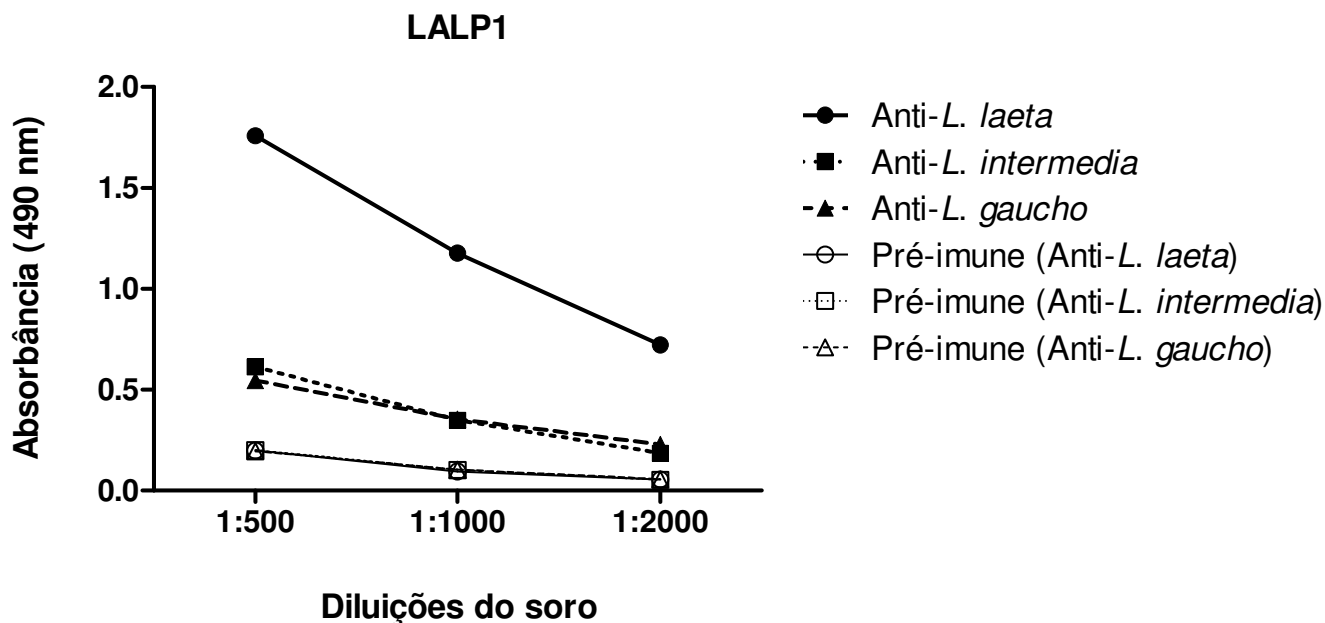


FIGURA 15: REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE LALP1 E ANTI-VENENOS DE *Loxosceles spp.* – ELISA. Ensaio de ELISA realizado utilizando como antígeno 1 µg de toxina recombinante LALP1/poço e como anticorpos primários soros hiperimunes anti-venenos totais de *Loxosceles spp.* em diferentes diluições (1:500, 1:1000, 1:2000). O eixo y indica as médias das absorbâncias obtidas. As diferenças entre os resultados obtidos dos soros hiperimunes e soros pré-imunes foram estatisticamente significativas, apresentando para todas as amostras $p < 0.001$.

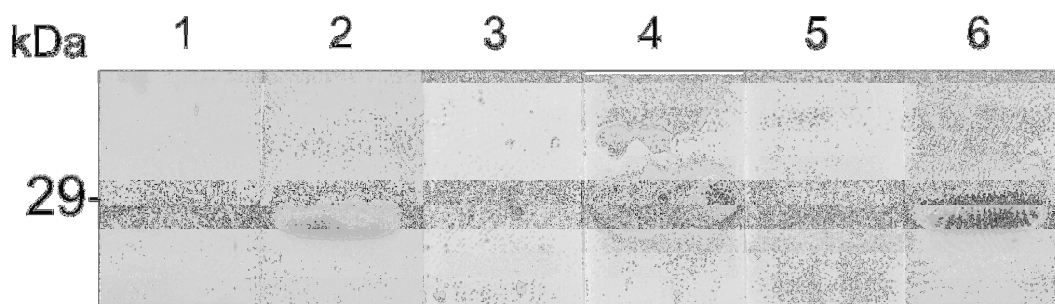


FIGURA 16: REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE LALP1 E ANTI-VENENOS DE *Loxosceles spp.* - Western blotting. Imunodeteção de LALP1 por soros hiperimunes anti-venenos totais de *Loxosceles spp.* Amostras de LALP1 (5µg cada amostra) após eletroforese SDS-PAGE foram transferidas para membranas de nitrocelulose. Depois do bloqueio de sítios inespecíficos foram incubadas separadamente com soros pré e hiperimunes anti-venenos (1:1000): soro anti-*L. laeta* (coluna 1 e 2, respectivamente), anti-*L. intermedia* (coluna 3 e 4, respectivamente) e anti-*L. gaucho* (coluna 5 e 6, respectivamente). Marcador de massa molecular à esquerda.

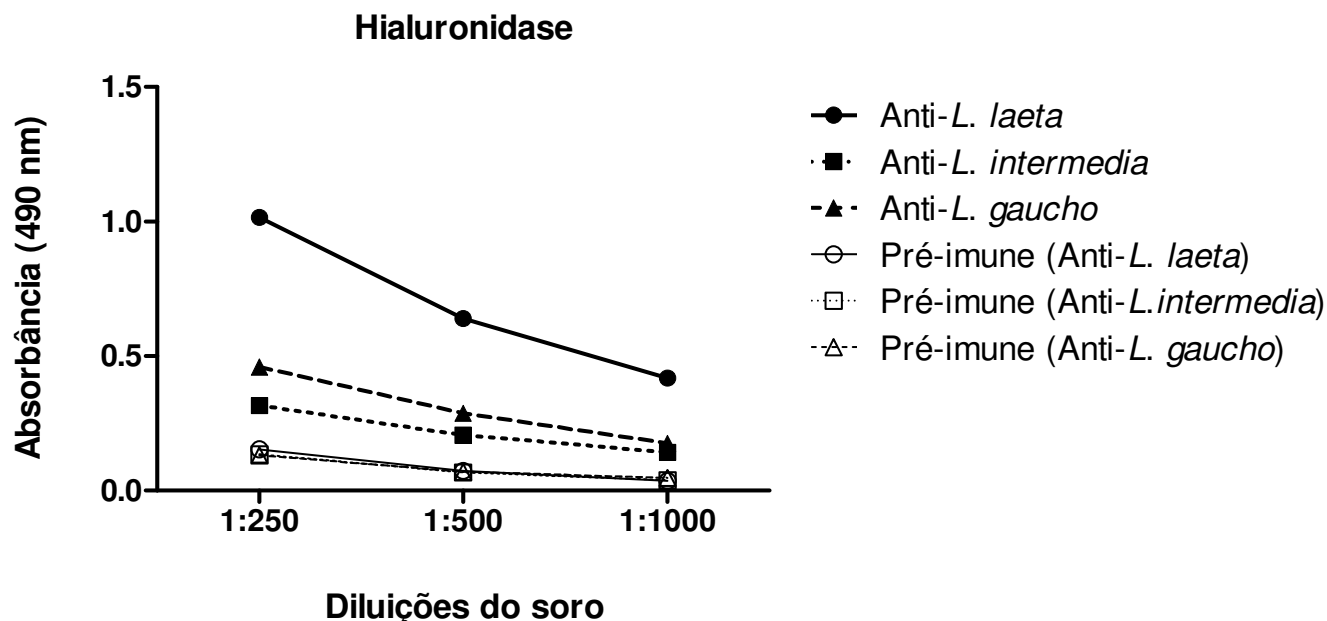


FIGURA 17: REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE HIALURONIDASE E ANTI- VENENOS DE *Loxosceles spp.* - ELISA Ensaio de ELISA realizado utilizando como antígeno 1 µg de toxina recombinante hialuronidase/poço e como anticorpos primários soros hiper imunes anti-venenos totais de *Loxosceles spp.* em diferentes diluições (1:250, 1:500, 1:1000). O eixo y indica as médias das absorbâncias obtidas. As diferenças entre os resultados obtidos dos soros hiperimunes e soros pré-imunes foram estatisticamente significativas, apresentando para todas as amostras $p < 0.001$.

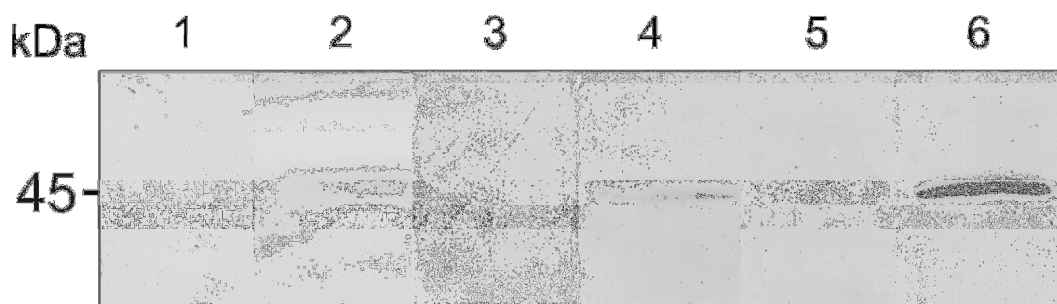


FIGURA 18: REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE HIALURONIDASE E ANTI- VENENOS DE *Loxosceles spp.* - Western blotting. Imunodetecção de hialuronidase por soros hiperimunes anti-venenos totais de *Loxosceles spp.* Amostras de hialuronidase (2 µg cada amostra) foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose. Após bloqueio de sítios inespecíficos foram incubadas separadamente com soros pré e hiperimunes anti-venenos (1:1000): soro anti-*L. laeta* (coluna 1 e 2, respectivamente), anti-*L. intermedia* (coluna 3 e 4, respectivamente) e anti-*L. gaucho* (coluna 5 e 6, respectivamente). Marcador de massa molecular à esquerda.

As figuras 15 e 16 mostram a conservação biológica das toxinas metaloproteases do tipo astacinas de aranhas do gênero *Loxosceles* avaliada pelo reconhecimento imunogênico de epítomos conformacionais e lineares. A metaloprotease recombinante da família das astacinas (LALP1) foi reconhecida em todas as diluições testadas (1:500, 1:1000 e 1:2000) no ensaio de ELISA (Figura 15) e, foi igualmente detectada pelos soros anti-veneno de *L. laeta*, *L. intermedia* e *L. gaucho* no ensaio de imunodeteção (Figura 16). Esses resultados corroboram com os resultados recentes obtidos por Trevisan-Silva e colaboradores (2010), que indicaram a existência de uma família de astacinas em *L. intermedia* e muito provavelmente, por todo gênero *Loxosceles*.

A toxina hialuronidase também foi investigada por imunoensaios e os resultados podem ser visualizados nas Figuras 17 e 18. Os três soros hiperimunes utilizados foram capazes de reconhecer os epítomos conformacionais e desnaturados ou lineares presentes na proteína recombinante hialuronidase de *Loxosceles intermedia*. No ensaio de ELISA, o reconhecimento da toxina recombinante foi significativo em todas as diluições empregadas. Porém, a reação positiva de reconhecimento no ensaio de imunodeteção variou em intensidade entre os soros utilizados (precipitado mais escuro para a reação com o soro anti-veneno de *L. gaucho* e mais claro para o soro de *L. laeta*). Esse fato poderia sugerir um conteúdo diferente de hialuronidase entre os venenos das três espécies ou, ainda, a existência de diferentes epítomos lineares em isoformas distintas. Contudo, não podemos novamente descartar as características já mencionadas inerentes as toxinas e sua imobilização, os soros policlonais e os testes utilizados.

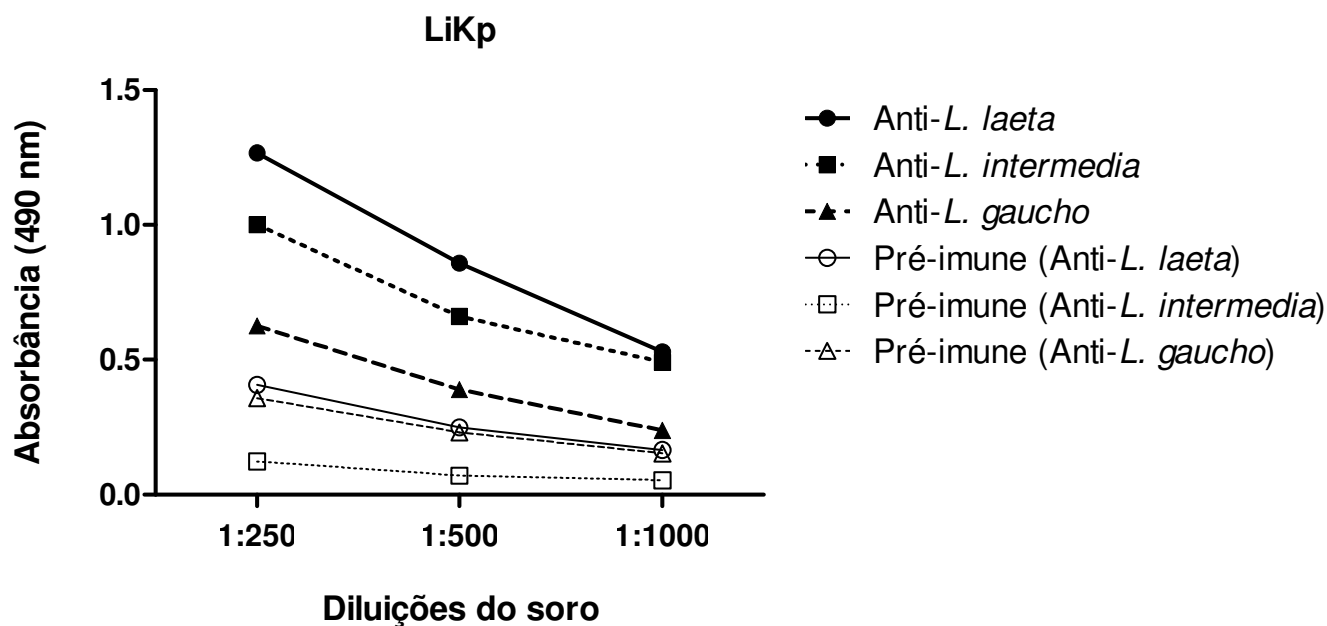


FIGURA 19: REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE LiKp E ANTI-VENENOS DE *Loxosceles spp.* – ELISA. Ensaio de ELISA realizado utilizando como antígeno 1 µg de toxina recombinante LiKp/poço e como anticorpos primários soros hiperimunes anti-venenos totais de *Loxosceles spp.* em diferentes diluições (1:250, 1:500, 1:1000). O eixo y indica as médias das absorbâncias obtidas. As diferenças entre os resultados obtidos dos soros hiperimunes e soros pré-imunes foram estatisticamente significativas para todos os soros, apresentando em todas as diluições $p < 0.001$.

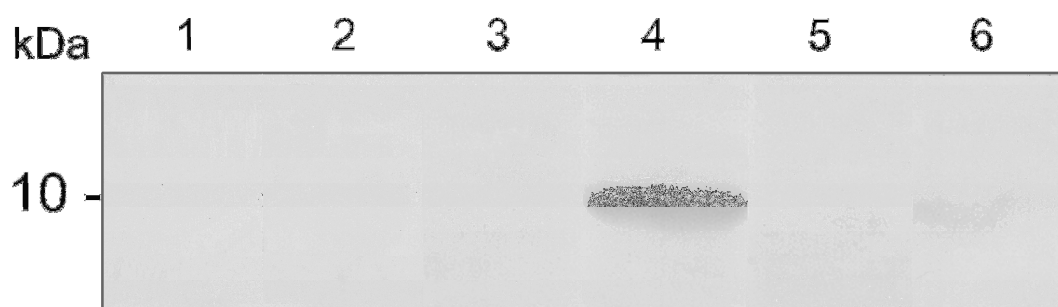


FIGURA 20: REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE LiKp E ANTI-VENENOS DE *Loxosceles spp.* – Western blotting. Imunodeteção de LiKp por soros hiperimunes anti-venenos totais de *Loxosceles spp.* Amostras de LiKp (5µg cada amostra) foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose. Após bloqueio de sítios inespecíficos foram incubadas separadamente com soros pré e hiper imunes anti-venenos (1:1000): soro anti-*L. laeta* (coluna 1 e 2, respectivamente), anti-*L. intermedia* (coluna 3 e 4, respectivamente) e anti-*L. gaucho* (coluna 5 e 6, respectivamente). Marcador de massa molecular à esquerda.

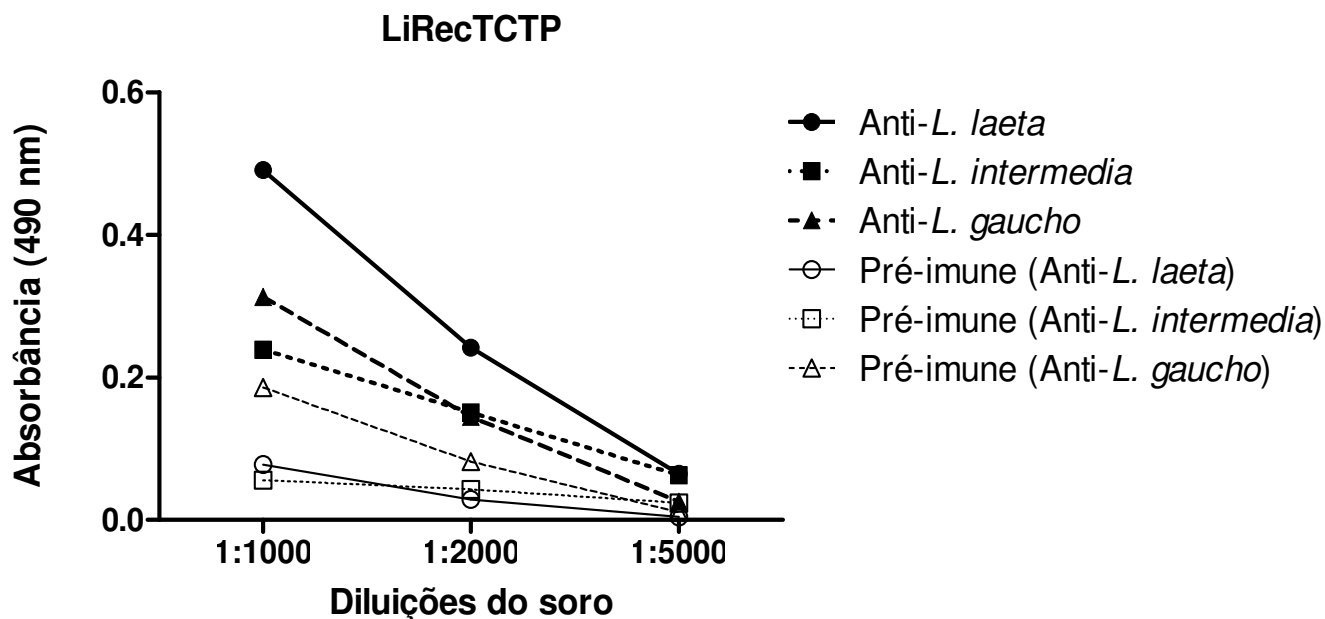


FIGURA 21: REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE LiRecTCTP E ANTI-VENENOS DE *Loxosceles* spp. – ELISA. Ensaio de ELISA realizado utilizando como antígeno 1 µg de toxina recombinante LiRecTCTP/poço e como anticorpos primários soros hiperimunes anti-venenos totais de *Loxosceles* spp. em diferentes concentrações (1:1000, 1:2000, 1:5000). O eixo y indica as médias das absorbâncias obtidas. As diferenças entre os resultados obtidos para os soros hiperimunes e pré-imunes foram significativas para anti-*L. intermedia*, anti-*L. laeta* (em todas as diluições) e anti-*L. gaucho* (1:1000, 1:2000), apresentando $p < 0.001$. As diferenças não foram estatisticamente significativas para anti-*L. gaucho* na diluição de 1:5000, apresentando $p > 0.05$.

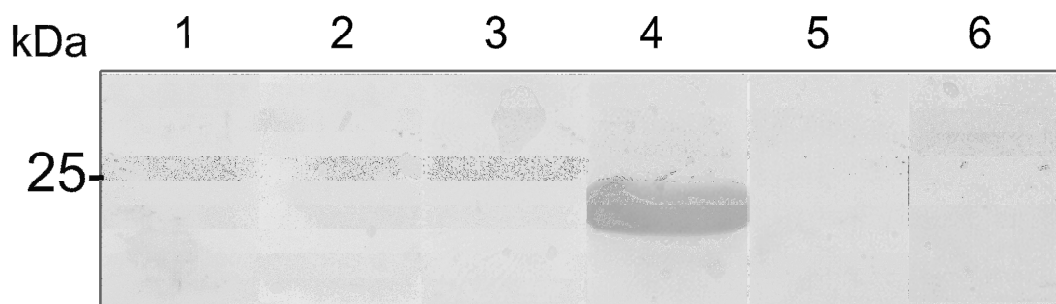


FIGURA 22: REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE LiRecTCTP E ANTI-VENENOS DE *Loxosceles* spp. - Western blotting. Imunodeteção de LiRecTCTP por soros hiperimunes anti-venenos totais de *Loxosceles* spp. Amostras da LiRecTCTP (5µg cada amostra) foram submetidas a eletroforese SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose. Após bloqueio de sítios inespecíficos foram incubadas separadamente com soros pré e hiperimunes anti-venenos (1:1000): soro anti-*L. laeta* (coluna 1 e 2 respectivamente), anti-*L. intermedia* (coluna 3 e 4 respectivamente) e anti-*L. gaucho* (coluna 5 e 6 respectivamente). Marcador de massa molecular à esquerda.

Os imunoenaios realizados com o peptídeo inseticida (LiKp) foram apresentados nas Figuras 19 e 20. Nos ensaios de ELISA o peptídeo foi reconhecido por todos os soros testados e em todas as diluições. Ou seja, os soros hiperimunes que reconhecem separadamente o veneno total de cada uma das espécies de aranha marrom (*L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*) reconheceram também o peptídeo inseticida (LiKp) em sua conformação nativa. O resultado do ensaio de imunodeteção mostra que este peptídeo foi reconhecido pelo soro de *L. intermedia*, e observou-se um precipitado fraco na altura da massa molecular do peptídeo na reação com o soro de *L. gaucho*. Esse dado sugere um possível reconhecimento, mas a reação positiva não está evidente. A análise do transcriptoma da glândula de veneno da aranha *Loxosceles intermedia* realizada por Gremski e colaboradores (2010), mostra que o número de transcritos referentes a peptídeos que codificam para a família de toxinas inseticidas denominadas LiTx, compreendem a maioria das toxinas expressas na glândula do veneno desta espécie (53%). Observou-se ainda que peptídeos de baixa massa molecular (<14kDa) aparecem em *L. intermedia*, assim como também aparecem no perfil eletroforético de *L. laeta*, porém, em uma menor concentração. O fato que mais chamou a atenção, e que pode sugerir uma explicação para o resultado visualizado neste estudo, é que nenhum dos peptídeos descritos no veneno de *L. intermedia* (GREMSKI *et al.*, 2010) coincide com aqueles descritos no transcriptoma da glândula de veneno de *L. laeta* (FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2008). Desta forma, um epítipo conformacional similar pode estar presente em ambos os distintos peptídeos inseticidas (presentes em ambos os venenos) levando ao reconhecimento de epítopos relacionados a LiKp no ensaio de ELISA. E paralelamente ao não reconhecimento de epítopos lineares presentes por exemplo em peptídeos descritos no transcriptoma da glândula de veneno de *L. laeta* que não coincidem com os descritos no de *L. intermedia*. Ou seja, diferentes peptídeos podem apresentar epítopos conformacionais similares, porém, epítopos lineares diferentes. Contudo, os outros fatores limitantes relacionados aos imunoenaios e as características dos reagentes utilizados (imunogenicidade do peptídeo, resposta imunológica individual, avaliação de epítopos lineares) não podem ser desconsiderados.

Os soros hiperimunes utilizados não foram capazes de reconhecer a proteína LiRecTCTP nas primeiras diluições utilizadas nos ensaios de ELISA (1:5000; 1:15000 e 1:30000), assim como ocorreu com as toxinas LALP1, hialuronidase e LiKp (dados não mostrados). Portanto, diluições mais baixas foram utilizadas para estas toxinas. Este fato está, muito provavelmente, relacionado à baixa representatividade destas toxinas no veneno loxoscélico (GREMSKI *et al.*, 2010). Portanto, as diluições de 1:1000, 1:2000 e 1:5000 dos soros hiperimunes foram utilizadas para favorecer o possível reconhecimento imunológico de isoformas da TCTP (Figura 21). O resultado obtido para os soros hiperimunes anti-veneno de *L. intermedia* e *L. gaucho* foram positivos em todas as diluições. E o soro hiperimune anti-veneno de *L. gaucho* reconheceu epítomos conformacionais relacionados a isoformas de LiRecTCTP nas diluições de 1:1000 e 1:2000. No ensaio de imunodeteção, a proteína LiRecTCTP (5µg) não foi reconhecida pelos soros anti-*L. laeta* e anti-*L. gaucho* na diluição de 1:1000 (Figura 22). E nas mesmas condições observou-se precipitado da reação positiva na faixa de aproximadamente 25kDa, apontando para o reconhecimento da proteína LiRecTCTP pelo soro anti-*L. intermedia*. O mesmo perfil de reconhecimento de LiRecTCTP por soros hiperimunes foi observado por Sade e colaboradores (2012). TCTP é uma proteína de baixa massa molecular (aproximadamente 20kDa), representante de uma família de moléculas altamente conservadas, amplamente expressa em diversos organismos e em 26 tecidos humanos. Estudos indicam a possibilidade de a TCTP agir como uma proteína de atuação constitutiva (“housekeeping”) (SADE *et al.*, 2012; BOMMER, THIELE, 2004). Por essa característica, poderia sugerir para a falta de reconhecimento de epítomos lineares (pelos soros hiperimunes anti-veneno total de *L. laeta* e *L. gaucho*), a hipótese de que LiRecTCTP desencadearia baixa resposta imunológica por ser muito semelhante à proteína homóloga presente no modelo animal que foi submetido à imunização. Contudo, ocorreu o reconhecimento pelo soro hiperimune de *Loxosceles intermedia* na imunodeteção (*western blotting*) e por todos os outros soros hiperimunes avaliados no ensaio de ELISA. Os quais também foram produzidos em coelhos. Ainda que consideremos a resposta imunológica individual de cada animal, devemos também considerar a baixa representatividade de TCTP nos outros venenos loxoscélicos. A TCTP é

encontrada em pouca quantidade no veneno total de *L. intermedia*, quando comparada com as toxinas dermonecróticas (fosfolipases-D). Gremski e colaboradores (2010), na análise do transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia*, encontraram apenas 1 cluster, 3 ESTs (*expressed sequence tags*), que anotados como relativos à proteína TCTP, correspondendo a apenas 0,4% do total de transcritos. Enquanto ESTs para fosfolipases-D perfazem aproximadamente 20,2% do total de transcritos. Estas diferenças no conteúdo de veneno poderiam levar a uma competição imunológica que resultaria em uma maior produção de anticorpos que reconhecem as proteínas mais abundantes e mais imunogênicas do veneno total. Estes dois fatores sugerem possíveis justificativas para o não reconhecimento da LiRecTCTP pelos soros policlonais utilizados no ensaio de imunodeteção (*western blotting*).

Nas Figuras 5 a 22, observou-se o reconhecimento imunológico de toxinas recombinantes de *L. intermedia* pelos soros hiperimunes que reconhecem os venenos totais das três espécies de *Loxosceles* estudadas neste trabalho.

4.2.2 Reconhecimento de toxinas do veneno total de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* por soros hiperimunes que reconhecem toxinas recombinantes de *L. intermedia*

Com o propósito de complementar a avaliação da conservação biológica das toxinas loxoscélicas entre as espécies *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* por meio de reconhecimento imunológico, novos imunoensaios foram realizados. As proteínas recombinantes identificadas no veneno de *L. intermedia* objetos de estudo deste trabalho foram avaliadas frente às toxinas nativas dos venenos de aranhas do gênero *Loxosceles*. Neste momento, os venenos totais das três espécies foram utilizados como antígeno. Os soros policlonais que reconhecem cada uma das toxinas loxoscélicas recombinantes de *L. intermedia* foram testados com cada um dos três venenos isoladamente. Esta segunda parte do trabalho possibilita a complementação da análise da reatividade imunológica cruzada de proteínas presentes nos venenos de *Loxosceles spp.* Nos imunoensaios mostrados a seguir utilizou-se como

anticorpos primários os soros hiperimunes: anti-LiRecDT1, anti-LALP1, anti-hialuronidase, anti-LiKp e anti-TCTP.

Nos imunoenaios para estudo da conservação biológica das toxinas fosfolipases-D loxoscélicas foi utilizado apenas o soro hiperimune anti-LiRecDT1, o qual reconhece todas as demais isoformas de fosfolipases-D recombinantes presentes e caracterizadas até o momento no veneno de *L. intermedia* (DA SILVEIRA *et al.*, 2007c; APPEL *et al.*, 2008).

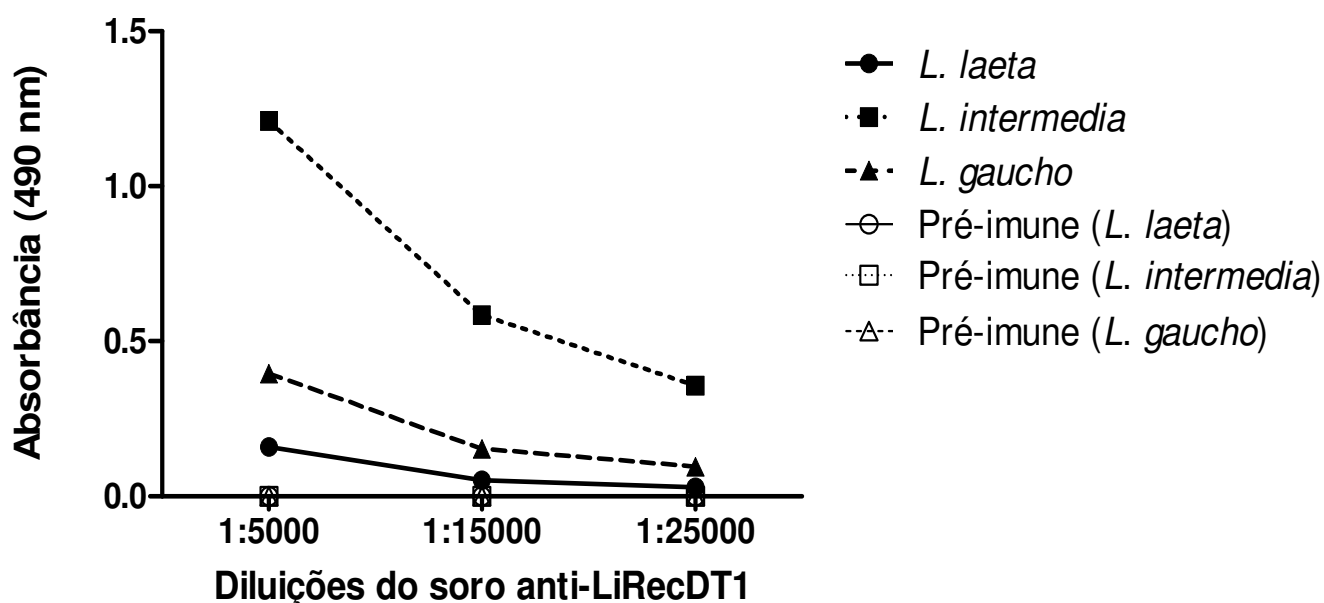


FIGURA 23: REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE SORO ANTI-LiRecDT1 E VENENOS DE *Loxosceles* spp. – ELISA. Ensaio de ELISA realizado utilizando como antígenos os venenos de *L. laeta*, *L. intermedia* e *L. gaucho* (1 µg/poço), como anticorpos primários soro hiperimune anti-LiRecDT1 em diferentes concentrações (1:5000, 1:15000, 1:25000). O eixo y indica as médias das absorbâncias obtidas. As diferenças foram estatisticamente significativas entre os resultados obtidos para o soro hiperimune e pré-ímune, apresentando para todas as amostras $p < 0.001$.

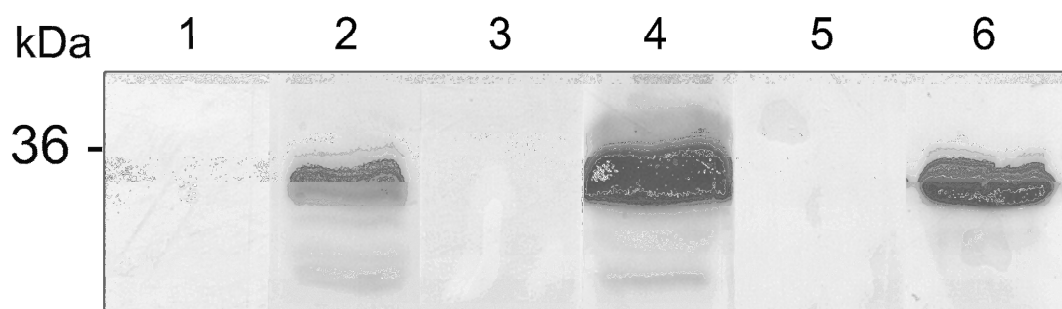


FIGURA 24: REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE SORO ANTI-LiRecDT1 E VENENOS DE *Loxosceles* spp. – Western blotting. Imunodeteção por soro hiperimune anti-LiRecDT1: colunas 1 e 2 contêm amostras de veneno de *L. laeta*; 3 e 4, de *L. intermedia*; 5 e 6, de *L. gaucho* (20µg de cada veneno total em cada amostra). As colunas pares mostram as bandas obtidas após a revelação das tiras de nitrocelulose incubadas com soro hiperimune anti- LiRecDT1 (1:1000). As colunas ímpares são os controles negativos em que as tiras de nitrocelulose foram incubadas com soros pré-ímmes (1:1000). Marcador de massa molecular à esquerda.

Nos imunoensaios realizados com soro policlonal que reconhece a toxina fosfolipase-D de *L. intermedia* LiRecDT1 (Figura 23 e 24) foi possível observar que houve reconhecimento de toxinas nativas (isoformas de fosfolipases-D) presentes em todos os venenos testados no ELISA, e em todas as diluições estudadas (1:5000, 1:15000 e 1:25000) (Figura 23). No ensaio de imunodeteção foram visualizadas bandas positivas na altura de massa molecular de aproximadamente 35 kDa, indicando o reconhecimento e conservação biológica de epítomos presentes em isoformas de fosfolipases-D interespecies de *Loxosceles* (Figura 24). Este reconhecimento de epítomos presentes nas fosfolipases-D também foi visualizado nos imunoensaios da primeira etapa deste trabalho (Figuras 5 a 14). A sobreposição destes resultados de reconhecimento imunológico aponta para a presença de proteínas nativas, nos três venenos analisados, com epítomos imunogênicos relacionados à LiRecDT1 e suas isoformas, caracterizadas no veneno de *L. intermedia*. Muitas isoformas desta toxina já foram relatadas como constituintes do veneno de diferentes espécies de aranha marrom (MACHADO *et al.*, 2005; RAMOS-CERRILLO *et al.*, 2004; TAMBOURGI *et al.*, 2004; FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2008; BARBARO *et al.*, 1996 e 2005; GOMEZ *et al.*, 2001;

OLVERA *et al.*, 2006; CATALAN *et al.*, 2011; BINFORD *et al.*, 2009; KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007 e 2002). As análises das sequências nucleotídicas e aminoacídicas das toxinas fosfolipases-D depositadas em bancos de dados mostram que estas toxinas dermonecróticas são conservadas entre as diferentes espécies do gênero *Loxosceles* (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009; GREMSKI *et al.*, 2010; MURAKAMI *et al.*, 2005) (Anexo I). A presença de muitas isoformas de uma mesma toxina em um mesmo veneno contribui para o aumento da toxicidade do veneno, uma vez que as várias isoformas exercem um efeito sinérgico sobre o organismo atingido (GREMSKI *et al.* 2010; RIBEIRO *et al.*, 2007). Apesar de muitos estudos mostrarem que as isoformas da toxina dermonecrótica são similares entre si (DA SILVEIRA *et al.*, 2006 e 2007c; APPEL, 2008; GREMSKI *et al.* 2010), Ribeiro e colaboradores (2007) mostraram que as isoformas LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3 apresentam diferenças quanto a presença de imunogenicidade cruzada (em imunoenaios a LiRecDT3 apresentou menor reatividade cruzada com o soro que reconhece o veneno total de *L. intermedia* em relação as demais isoformas) e quanto a atividade dermonecrótica. Estes resultados fortaleceram observações feitas anteriormente em torno da existência de substituições na sequência de aminoácidos da toxina LiRecDT3 em um sítio próximo ao envolvido com a atividade catalítica. Estes aminoácidos não conservados na sequência desta toxina poderiam modificar características físico-químicas da proteína e desta maneira interferir nas suas atividades biológicas (DA SILVEIRA *et al.*, 2007c). Com base nestes dados, evidenciamos que a conservação biológica em resíduos de aminoácidos envolvidos com o sítio catalítico e a similariedade estrutural entre isoformas não se reflete obrigatoriamente na conservação imunológica das toxinas. E ainda que a imunogenicidade de cada isoforma de toxina está intimamente relacionada com peculiaridades que compõe o seu conjunto de epítomos imunogênicos e a sua estrutura tridimensional. Os resultados obtidos nas duas etapas de imunoenaios evidenciam de um modo geral a conservação de epítomos lineares e/ou estruturais presentes em isoformas relacionadas com as fosfolipases-D de *L. intermedia* nos diferentes venenos. Contudo, podemos observar diferentes níveis de intensidade nas reações de imunodeteção de uma mesma toxina em diferentes venenos e de diferentes venenos com o antissoro que reconhece a LiRecDT1.

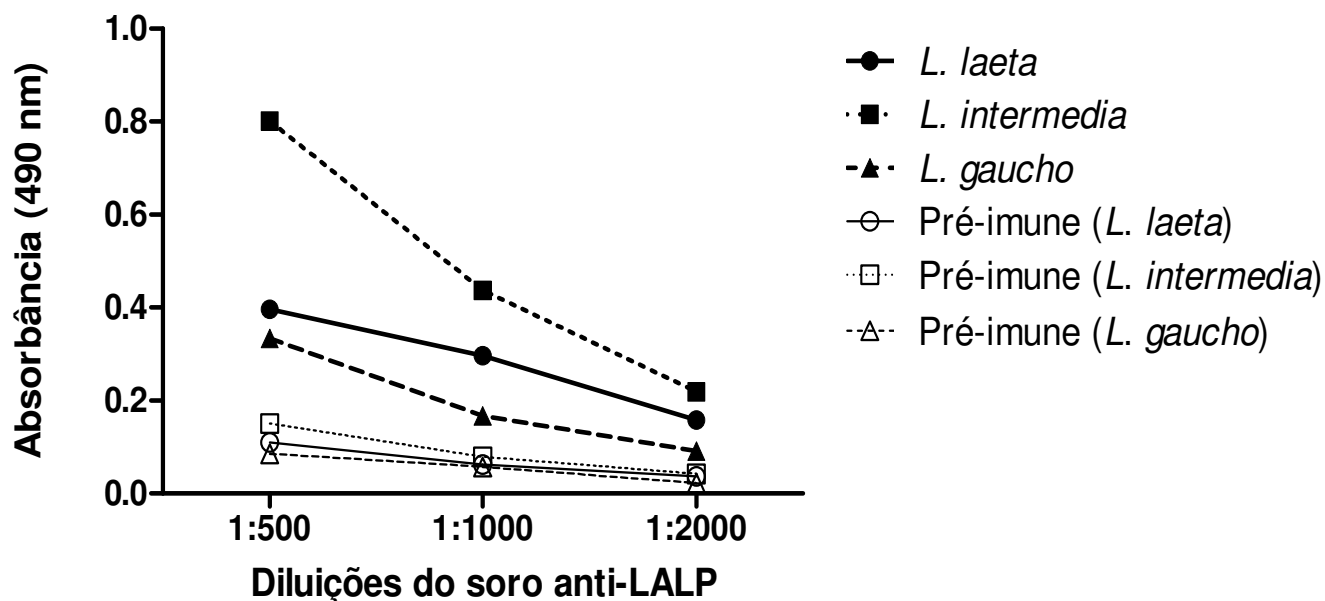


FIGURA 25: REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE SORO ANTI-LALP1 E VENENOS DE *Loxosceles* spp. – ELISA. Ensaio de ELISA realizado utilizando como antígenos os venenos de *L. laeta*, *L. intermedia* e *L. gaucho* (1 µg/poço), como anticorpos primários soro hiperimune anti-LALP1 em diferentes concentrações (1:500, 1:1000, 1:2000). O eixo y indica as médias das absorbâncias obtidas. As diferenças foram estatisticamente significativas entre os resultados obtidos para o soro hiperimune e pré-imune, apresentando para todas as amostras $p < 0.001$.

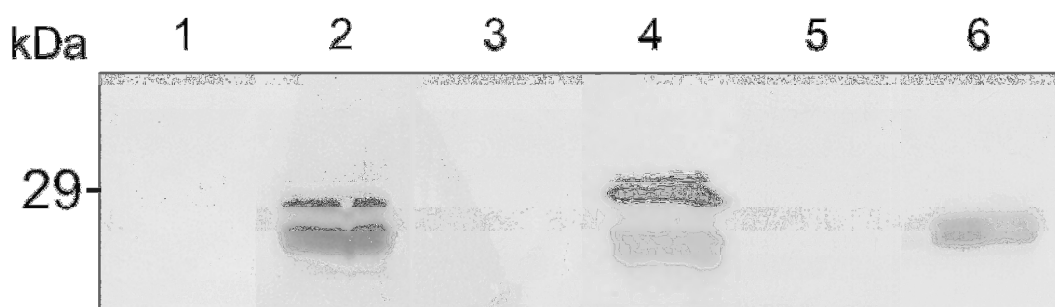


FIGURA 26: REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE SORO ANTI-LALP1 E VENENOS DE *Loxosceles* spp. – Western blotting. Imunodetecção por soro hiperimune anti-LALP1: colunas 1 e 2 contém amostras de veneno de *L. laeta*; 3 e 4, de *L. intermedia*; 5 e 6, de *L. gaucho* (20 µg de cada veneno total em cada amostra). As colunas pares mostram as bandas obtidas após a revelação das tiras de nitrocelulose incubadas com soro hiperimune anti-LALP1 (1:1000). As colunas ímpares são os controles negativos em que as tiras de nitrocelulose foram incubadas com soros pré-imunes (1:1000). Marcador de massa molecular à esquerda.

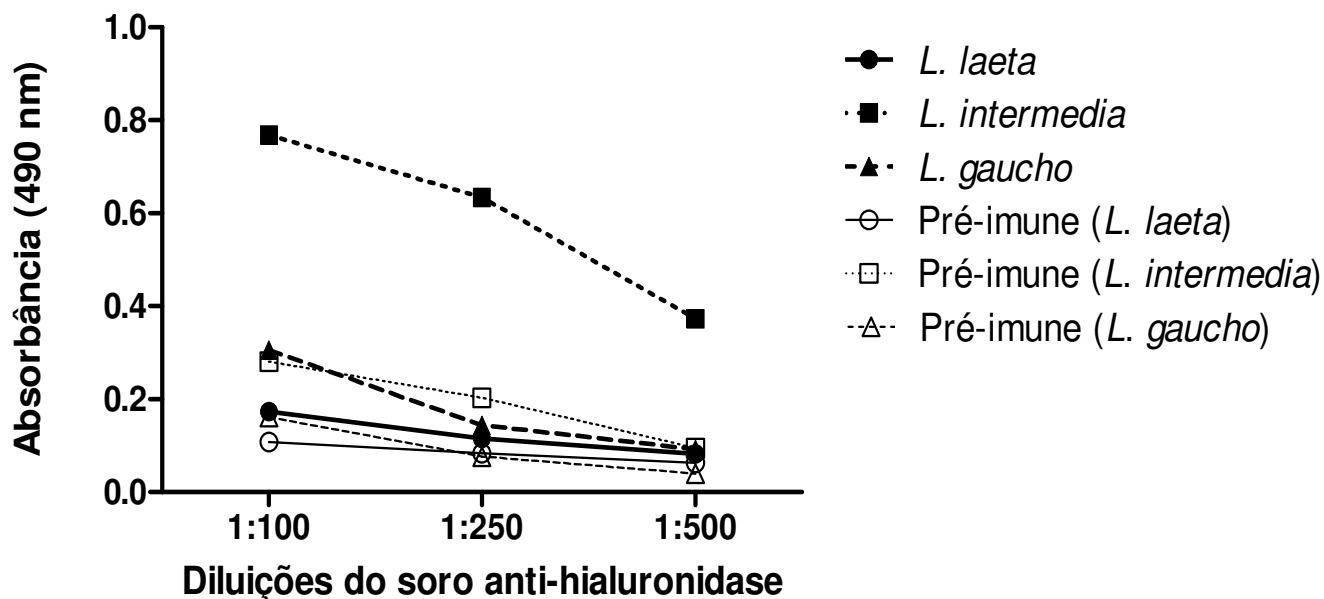


FIGURA 27: REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE SORO ANTI-HIALURONIDASE E VENENOS DE *Loxosceles* spp. - ELISA. Ensaio de ELISA realizado utilizando como antígenos os venenos de *L. laeta*, *L. intermedia* e *L. gaucha* (1 µg/poço), como anticorpos primários soro hiperimune anti-hialuronidase em diferentes concentrações (1:100, 1:250, 1:500). O eixo y indica as médias das absorbâncias obtidas. As diferenças foram estatisticamente significativas entre os resultados obtidos para o soro hiperimune e pré-imune. Apresentando para a diluição 1:500 do soro quando incubado com amostra do veneno de *L. laeta* $p < 0.05$, para as demais diluições do soro e demais amostras $p < 0.001$.

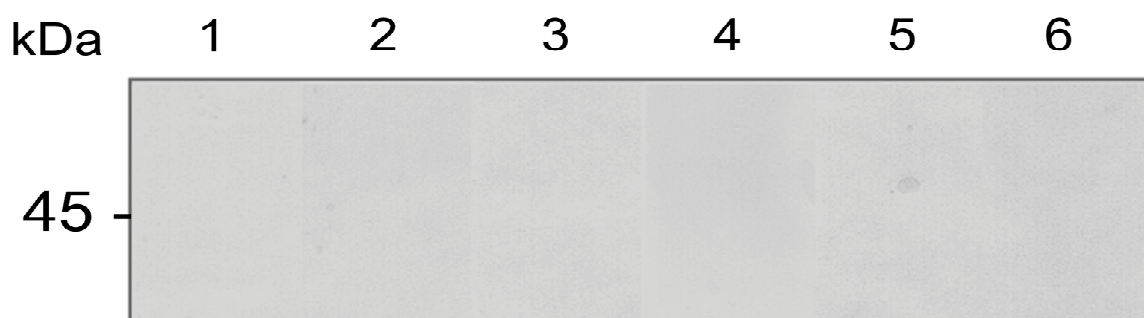


FIGURA 28: REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE SORO ANTI-HIALURONIDASE E VENENOS DE *Loxosceles* spp. – Western blotting. Imunodeteção por soro hiperimune anti-hialuronidase: colunas 1 e 2 contêm amostras de veneno de *L. laeta*; 3 e 4, de *L. intermedia*; 5 e 6, de *L. gaucha* (50µg de cada veneno total em cada amostra). As colunas pares mostram as amostras após a revelação das tiras de nitrocelulose incubadas com soro hiperimune anti-hialuronidase (1:1000). As colunas ímpares são os controles negativos em que as tiras de nitrocelulose foram incubadas com soros pré-ímmes (1:1000). Marcadores de massa molecular à esquerda.

Epítomos conformacionais e lineares da proteína recombinante LALP1 foram reconhecidos nos venenos de todas as espécies de *Loxosceles* estudadas (Figura 25 e 26). Confirmando os resultados obtidos nos imunoensaios na etapa 1 (Figuras 15 e 16). Estes resultados mostram que metaloproteases presentes nos venenos de *L. laeta*, *L. gaucho* e *L. intermedia* apresentam epítomos conservados, além de corroborar com dados da literatura que descrevem a presença de metaloproteases em diferentes espécies de aranhas do gênero *Loxosceles* (FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2008; TREVISAN-SILVA *et al.*, 2010; GREMSKI *et al.*, 2010). A presença de mais de uma banda positiva nos imunoensaios está relacionada com a existência de uma família de astacinas intra-espécie (TREVISAN-SILVA *et al.*, 2010). Em 2010, Trevisan-Silva e colaboradores verificaram a positividade entre as sequências das isoformas de metaloproteases de *L. intermedia* (LALP1 a 3) e entre as isoformas de *L. intermedia* com isoformas identificadas em *L. laeta* (LALP4) e *L. gaucho* (LALP5). O resultado obtido da comparação entre isoformas de metaloproteases de *L. intermedia* foi o seguinte: LALP2 e LALP3 apresentaram maior positividade (55%), LALP2 apresentou 43% com LALP1 e a LALP3 46% com a LALP1. Na comparação de isoformas de metaloproteases inter-espécies foi possível observar o seguinte: a isoforma utilizada neste trabalho (LALP1) apresentou 75% de positividade com as isoformas de *L. laeta* e *L. gaucho* (LALP4 e LALP5) estes dados corroboram com os dados imunológicos obtidos neste trabalho, pois observou-se a conservação de epítomos entre as espécies. A isoforma LALP4 apresentou 44% de positividade com LALP2 e 48% com LALP3. E não muito diferente, a LALP5 apresentou 39% de similariedade com a LALP2 e 40% com a LALP3. Contudo, as comparações entre as isoformas de *L. laeta* e *L. gaucho* com as demais isoformas são menos informativas pelo fato das isoformas LALP4 e LALP5 serem sequências parciais.

Enzimas relacionadas à hialuronidase de *L. intermedia* foram reconhecidas no veneno das três espécies estudadas no ensaio de ELISA, caracterizando o reconhecimento de epítomos conformacionais presentes em toxinas nativas nestes venenos (Figura 27). O reconhecimento ocorreu em todas as diluições do soro policlonal anti-hialuronidase utilizadas, contudo estas diluições utilizadas foram diluições baixas e menores do que as utilizadas nos

outros ensaios de ELISA para as outras toxinas. A necessidade de grande quantidade de soro policlonal para viabilizar o reconhecimento imunológico de toxinas nativas está, muito provavelmente, relacionada ao fato da hialuronidase ser uma toxina pouco representativa no veneno loxoscélico. A análise do transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia* mostrou que apenas 0,05% dos transcritos totais codificam para a hialuronidase (GREMSKI *et al.*, 2010). Segundo Fernandes-Pedrosa e colaboradores (2008) os transcritos que codificam para a hialuronidase no veneno de *L. laeta* perfazem 0,13% do total de transcritos. Contudo, não podemos descartar que uma pouca interação das toxinas hialuronidasas loxoscélicas nativas dos venenos com o poço da placa de ELISA também possa estar relacionada aos baixos valores de absorbância e à necessidade de baixa diluição de soro hiperimune. O reconhecimento de epítomos lineares presentes nas enzimas nativas relacionadas com a hialuronidase recombinante de *L. intermedia* não ocorreu nas condições experimentais utilizadas no *western blotting* (Figura 28). A ausência de reconhecimento pelo soro hiperimune que reconhece a enzima hialuronidase de *L. intermedia* foi visualizado no ensaio de imunodeteção não apenas para os venenos de *L. gaucha* e *L. laeta*, mas intrigantemente até mesmo para *L. intermedia*. Quando analisamos a reação inversa na imunodeteção da primeira etapa (Figura 18) observamos que existe o reconhecimento da hialuronidase recombinante pelos soros anti-veneno de todas as espécies estudadas. A ausência de reconhecimento no ensaio de imunodeteção com os venenos totais imobilizados muito provavelmente está relacionada com a baixa representatividade da enzima nos venenos, e consequente pouca apresentação de epítomos lineares na amostra de veneno total. Diferentemente de quando somente a toxina recombinante, em uma quantidade alta (5 µg) se encontrava imobilizada na membrana e disponível para que a reação acontecesse (como ocorre na primeira etapa). Outro fator que pode estar relacionado com a ausência de reação positiva no *western blotting* seria a prevalência de epítomos conformacionais na toxina hialuronidase de aranha marrom.

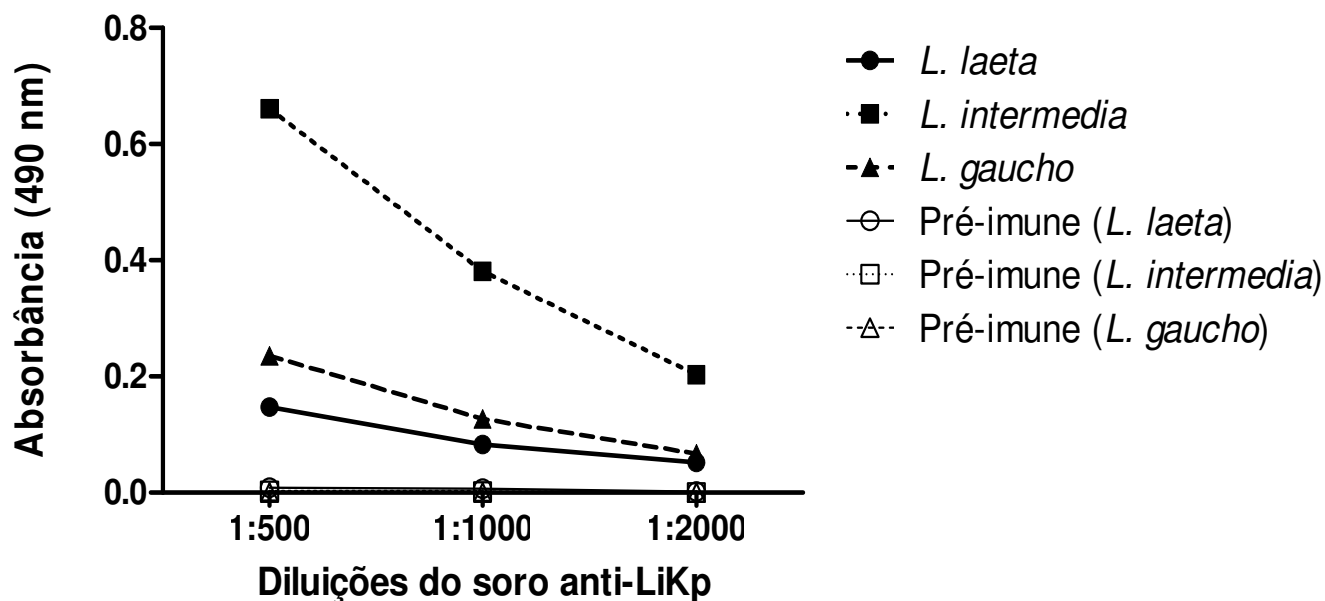


FIGURA 29: REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE SORO ANTI-LiKp E VENENOS DE *Loxosceles* spp. – ELISA. Ensaio de ELISA realizado utilizando como antígenos os venenos de *L. laeta*, *L. intermedia* e *L. gauchoi* (1 µg/poço), como anticorpos primários soro hiperimune anti-LiKp em diferentes concentrações (1:500, 1:1000, 1:2000). O eixo y indica as médias das absorbâncias obtidas. As diferenças foram estatisticamente significativas entre os resultados obtidos para o soro hiperimune e pré-imune, apresentando para todas as amostras $p < 0.001$.

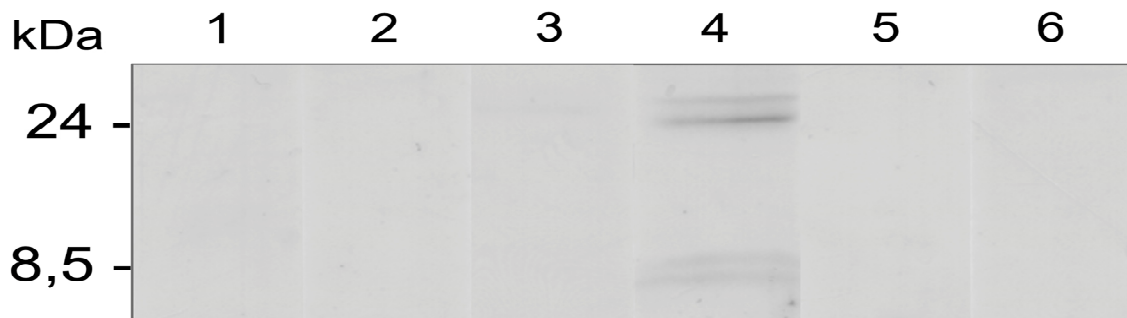


FIGURA 30: REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE SORO ANTI-LiKp E VENENOS DE *Loxosceles* spp. – Western blotting. Imunodeteção por soro hiperimune anti-LiKp: colunas 1 e 2 contém amostras de veneno de *L. laeta*; 3 e 4, de *L. intermedia*; 5 e 6, de *L. gauchoi* (50µg de cada veneno total em cada amostra). As colunas pares mostram as amostras após a revelação das tiras de nitrocelulose incubadas com soro hiperimune anti-hialuronidase (1:1000). As colunas ímpares são os controles negativos em que as tiras de nitrocelulose foram incubadas com soro pré-imune (1:1000). Marcador de massa molecular à esquerda.

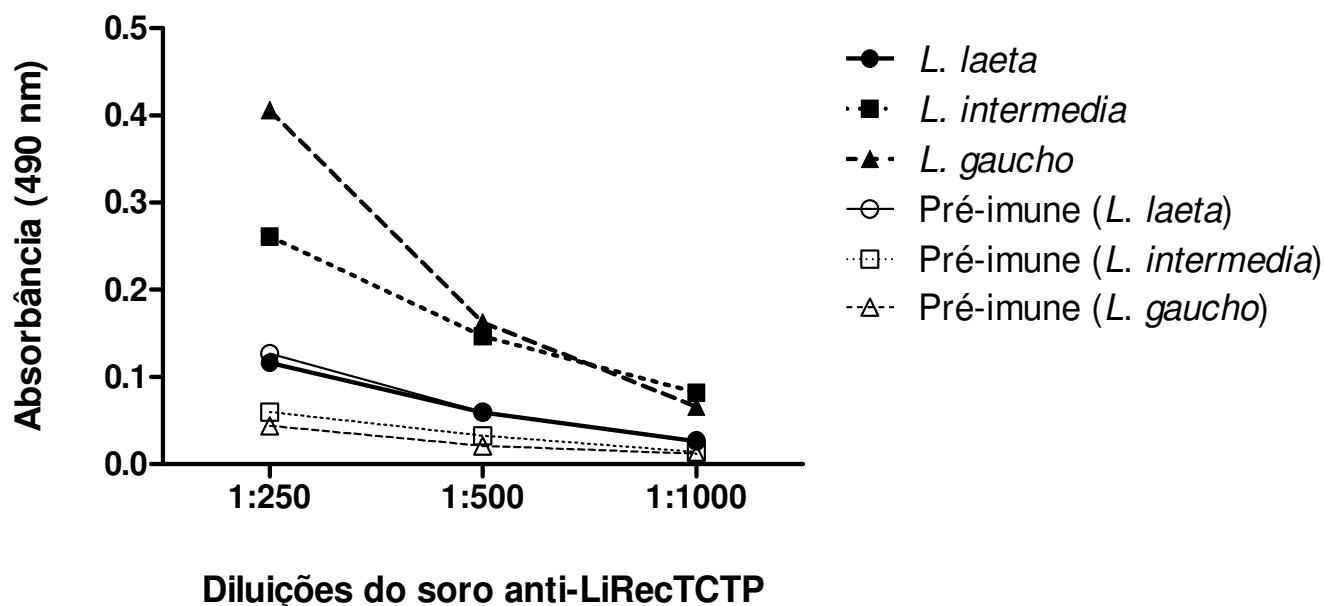


FIGURA 31: REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE SORO ANTI-TCTP E VENENOS DE *Loxosceles* spp. – ELISA. Ensaio de ELISA realizado utilizando como antígenos os venenos de *L. laeta*, *L. intermedia* e *L. gaucho* (1 µg/poço), como anticorpos primários soro hiperimune anti-LiRecTCTP em diferentes concentrações (1:250, 1:500, 1:1000). O eixo y indica as médias das absorbâncias obtidas. As diferenças foram estatisticamente significativas entre os resultados obtidos para os soros hiperimune e pré-imune quando incubados com amostras de veneno de *L. intermedia* e *L. gaucho* (todas as diluições), apresentando $p < 0,001$. As diferenças não foram estatisticamente significativas somente quando o soro hiperimune foi incubado com amostras de veneno de *L. laeta* ($p > 0,05$).

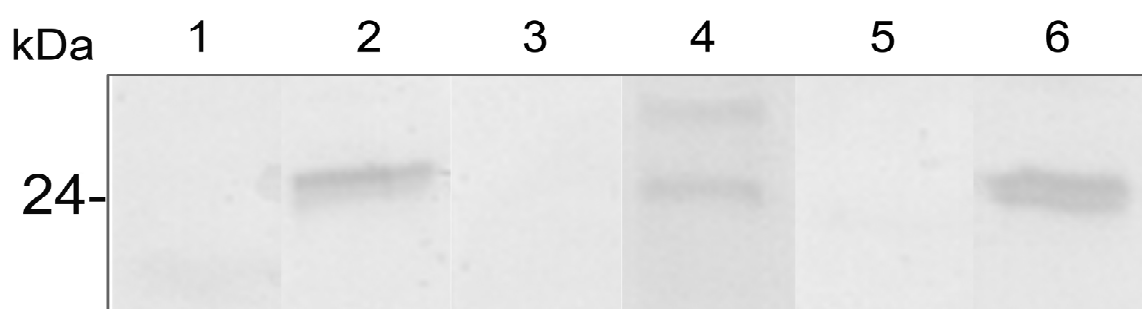


FIGURA 32: REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE SORO ANTI-TCTP E VENENOS DE *Loxosceles* spp. – Western blotting. Imunodeteção por soro hiperimune anti-LiRecTCTP: colunas 1 e 2 contém amostras de veneno de *L. laeta*; 3 e 4, de *L. intermedia*; 5 e 6, de *L. gaucho* (50 µg de cada veneno total em cada amostra). As colunas pares mostram as bandas obtidas após a revelação das tiras de nitrocelulose incubadas com soro hiperimune anti-LiRecDT1 (1:1000). As colunas ímpares são os controles negativos em que as tiras de nitrocelulose foram incubadas com soros pré-ímunos (1:1000). Marcador de massa molecular à esquerda.

O soro produzido a partir da imunização de coelhos com o peptídeo inseticida recombinante (LiKp), reconheceu epítomos conformacionais presentes em todos os venenos estudados (*L. laeta*, *L. intermedia* e *L. gaucho*) (Figura 29). A conservação imunobiológica de epítomos conformacionais presentes em peptídeos relacionados com LiKp nos três venenos foi verificada tanto na primeira, quanto na segunda etapa deste trabalho, nos ensaios de ELISA (Figura 19 e 29). Portanto, ainda que *L. laeta* apresente peptídeos não relacionados com os peptídeos de *L. intermedia*, pertencentes a classes diferentes (FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2008; GREMSKI *et al.*, 2010), existem toxinas de baixa massa molecular com epítomos imunogênicos relacionados nos três venenos. No ensaio de imunodeteção, epítomos lineares presentes no peptídeo inseticida LiKp só foram reconhecidos no veneno *L. intermedia* (Figura 30). É possível visualizar a presença de duas bandas de reação positiva, uma com mobilidade eletroforética na altura aproximada de 9 kDa e outra na altura aproximada de 24 kDa. Estes resultados sugerem o reconhecimento do peptídeo LiKp (com massa molecular de 9 kDa) e o reconhecimento de um complexo com 3 moléculas de LiKp (massa molecular de 24 kDa). Este provável trímero apresentou mobilidade eletroforética três vezes maior que a massa molecular do peptídeo. Os peptídeos presentes no veneno de *L. intermedia*, em sua maioria são da classe das notinas, e compreendem a maioria dos transcritos da glândula de veneno de *L. intermedia* (cerca de 23% do total de ESTs e 53.5% do total de ESTs de toxinas) (GREMSKI *et al.*, 2010). Estes peptídeos são nomeados como notinas, porque apresentam um motivo estrutural chamado de “nó de cistina inibidor”, ICK (*Inhibitor C*istyne *K*not). Esse motivo é estabelecido porque estes peptídeos apresentam 3 a 5 pontes dissulfeto intracadeia e sua massa molecular pode variar de 3-10 kDa (MATSUBARA, 2011). Essas características facilitam a dimerização dos peptídeos e esses dímeros se desfazem em condições redutoras. No protocolo dos ensaios de imunodeteção as amostras são tratadas com o agente redutor β -mercaptoetanol (5%, adicionado ao tampão de amostra) e colocadas em banho-maria fervente por 5 minutos. A presença de proteínas associadas mesmo após este procedimento pode estar relacionada com a estrutura tridimensional destes peptídeos, que apresentam várias pontes dissulfeto e

algumas em regiões de difícil acesso, no interior da molécula (SAEZ *et al.*, 2010; MATSUBARA, 2011). Outra possibilidade é que o agente redutor utilizado tenha quebrado as pontes dissulfeto do peptídeo, mas o ambiente não era redutor o suficiente para inibir a formação de novas pontes dissulfeto entre moléculas de peptídeo ou mesmo entre o peptídeo e outras moléculas do veneno. Na avaliação dos epítomos lineares de LiKp, os resultados sugerem de modo geral a ausência conservação imunogênica desses epítomos entre as espécies avaliadas (Figura 20 e 30). Nos resultados obtidos nas duas etapas o reconhecimento foi evidente apenas para a espécie *L. intermedia*. Pode existir uma prevalência de epítomos conformacionais, uma vez que no ELISA ocorreu reconhecimento nos três venenos. Contudo, devem ser considerados os outros fatores interferentes já comentados como: imunogenicidade do peptídeo; resposta imunológica individual, utilização de soro policlonal e avaliação de epítomos lineares. No transcriptoma de *L. intermedia*, além da alta quantidade de transcritos similares às sequências de peptídeos inseticidas (LiTx1, LiTx2, LiTx3 e LiTx4), foi observada a existência de muitas isoformas distintas desta toxina. Estas diferentes isoformas podem apresentar diferenças quanto à seletividade e forma de interação destas moléculas com seus receptores, e também imunogenicidade distinta (GREMSKI *et al.*, 2010). Estes peptídeos estão relacionados com a paralisação da presa e, portanto, tem função bastante importante para aranha, daí a presença de isoformas da toxina LiKp nos venenos de *Loxosceles* (MATSUBARA, 2011). Mesmo toxinas com sequências com grande similaridade podem levar a produção de soros com reconhecimento de epítomos imunogênicos diferentes (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012).

Nas Figuras 31 e 32 estão os resultados do reconhecimento pelo soro anti-LiRecTCTP ensaiado com os diferentes venenos loxoscélicos. No ensaio de ELISA observamos um reconhecimento significativo de toxina relacionada à LiRecTCTP no veneno de *L. intermedia* e *L. gaucho*, em todas as diluições utilizadas. Já no veneno de *L. laeta* não foi possível verificar o reconhecimento significativo de isoformas relacionadas à LiRecTCTP pelo soro hiperimune que reconhece a toxina recombinante (anti-LiRecTCTP). Como comentado anteriormente a TCTP é uma toxina presente em baixa quantidade no veneno de *L. intermedia*, o que poderia dificultar seu reconhecimento. Mas não

podemos descartar uma baixa interação das toxinas TCTPs loxoscélicas nativas dos venenos com o poço da placa de ELISA, o que levaria aos baixos valores de absorbância e à necessidade de baixos títulos de soro hiperimune. Entretanto, no ensaio de imunodeteção, pode-se observar o reconhecimento da toxina TCTP nos três venenos ensaiados pelo soro anti-LiRecTCTP (diluição 1:1000) (Figura 32). As prováveis isoformas detectadas na altura da massa molecular correspondente a toxina TCTP de *L. intermedia* sugerem a presença de epítomos lineares conservados entre as três espécies estudadas. Os resultados obtidos com o soro hiperimune que reconhece a LiRecTCTP (Figura 31) não se sobrepuseram aos obtidos na primeira etapa (Figura 21). Na primeira etapa no ensaio de ELISA foi possível obter o reconhecimento de epítomos conformacionais presentes na proteína recombinante LiRecTCTP pelos soros hiperimunes que reconhecem cada um dos venenos loxoscélicos testados (veneno de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucha*). Contudo, na segunda etapa também no ensaio de ELISA não foi possível observar o reconhecimento significativo pelo soro hiperimune produzido para reconhecer a LiRecTCTP em amostras do veneno de *L. laeta*. Estes resultados podem estar relacionados com o fato da TCTP ser pouco representativa no veneno total, quando somente a proteína recombinante LiRecTCTP é imobilizada nos pocinhos da placa de ELISA exclui-se a característica de ser pouco representativa. E sua baixa imunogenicidade, já comentada anteriormente, seria mais um fator de desfavorecimento. Nesta segunda etapa, o soro hiperimune policlonal utilizado reconhece apenas e especificamente a proteína recombinante LiRecTCTP, descartando desta vez a interferência da imunogenicidade (competição imunológica) da toxina TCTP frente as outras toxinas que compõem os venenos. O fato do soro anti-LiRecTCTP reconhecer epítomos em proteínas relacionadas com a TCTP no veneno de *L. laeta* no ensaio de imunodeteção e não reconhecer epítomos conformacionais no ELISA pode ter diferentes explicações. Esses resultados podem sugerir que a proteína TCTP nativa de *L. laeta* apresenta características estruturais e de carga em sua sequência aminoácida que não favoreceram a sua interação com a placa do ensaio de ELISA; ou a interação com a placa (favorecida por determinados resíduos de aminoácidos) acaba escondendo possíveis epítomos conformacionais; ou ainda que esta toxina exista em quantidade bastante reduzida no veneno de *L. laeta*

que não permitiu que houvesse uma quantidade suficiente de TCTP no poço da placa de ELISA que alcançasse a sensibilidade do método de detecção. Contudo, dados das sequências aminoacídicas de TCTP obtidas no transcriptoma de *L. intermedia* e no de *L. laeta* apresentaram 97% de positividade (GREMSKI *et al.*, 2010). Ainda devemos sempre considerar que os estudos de transcriptoma não avaliam a tradução destes transcritos, que pode ser controlada por diferentes mecanismos pós-transcricionais. A possibilidade da quantidade desta proteína variar de acordo com diferentes momentos da vida do animal também não pode ser descartada (SADE *et al.*, 2012).

A grande maioria dos resultados obtidos nesta segunda etapa de imunoensaios, com a utilização dos venenos totais das três espécies de *Loxosceles* estudadas, corroboram com os resultados obtidos na primeira etapa com as toxinas recombinantes de *L. intermedia*. Desta maneira, mostrando a conservação biológica de epítomos imunogênicos entre toxinas das três diferentes espécies de *Loxosceles*. E ainda que muitas isoformas distintas de uma mesma família de toxinas possam apresentar os mesmos epítomos ou epítomos semelhantes. Nas tabelas seguintes uma síntese dos resultados obtidos nos imunoensaios das duas etapas deste trabalho.

TABELA 1: RECONHECIMENTO DAS TOXINAS RECOMBINANTES DE *L. intermedia* PELOS SOROS ANTI-VENENOS LOXOSCÉLICOS

Toxina Recombinante	Soro policlonal Anti- <i>L. laeta</i>		Soro policlonal Anti- <i>L. intermedia</i>		Soro policlonal Anti- <i>L. gaucho</i>	
	ELISA	WB	ELISA	WB	ELISA	WB
LiRecDT1	+	+	+	+	+	+
LiRecDT2	+	+	+	+	+	+
LiRecDT3	+	+	+	+	+	+
LiRec DT5	+	+	+	+	+	+
LiRecDT6	+	+	+	+	+	+
LALP1	+	+	+	+	+	+
Hialuronidase	+	+	+	+	+	+
LiKp	+	-	+	+	+	+
LiRecTCTP	+	-	+	+	+	-

(+) = Reconhecimento (*) = Baixo reconhecimento (-) = Ausência de reconhecimento
WB: imunodeteção por *western blotting*.

TABELA 2: RECONHECIMENTO DAS TOXINAS PRESENTES NOS VENENOS DE *Loxosceles SPP.* PELOS SOROS ANTI-TOXINAS RECOMBINANTES DE *L. intermedia*

Soro Policlonal	Veneno de <i>L. laeta</i>		Veneno de <i>L. intermedia</i>		Veneno de <i>L. gaucho</i>	
	ELISA	WB	ELISA	WB	ELISA	WB
Anti-LiRecDT1	+	+	+	+	+	+
Anti-LALP1	+	+	+	+	+	+
Anti -Hialuronidase	+	-	+	-	+	-
Anti-LiKp	+	-	+	+	+	-
Anti-LiRecTCTP	-	+	+	+	+	+

(+) = Reconhecimento (-) = Ausência de reconhecimento

WB: imunodeteção por *western blotting*.

4.3 Detecção de toxina loxoscélica em extratos de tecidos de animais submetidos a tratamento *in vivo* com veneno loxoscélico

Com o objetivo de avaliar a capacidade dos soros hiperimunes no reconhecimento de toxinas loxoscélicas em tecido renal de animais submetidos a envenenamento experimental foram realizados ensaios de imunodeteção com extratos proteicos de rim. Nestes ensaios os camundongos foram tratados com 1mg/Kg de veneno total de *L. intermedia* por via subcutânea e após 4 horas, os animais foram submetidos à perfusão e os órgãos retirados. O extrato dos rins foi utilizado nos ensaios de imunodeteção (Figura 33).

O material escolhido para este ensaio foi os rins devido a este órgão estar bastante relacionado aos sintomas clínicos observados no Loxoscelismo. Alterações laboratoriais (hemoglobínúria e proteinúria) indicam possíveis danos renais em vítimas de loxoscelismo (FUTRELL, 1992). Diferentes estudos com o objetivo de investigar e melhor entender tais efeitos foram desenvolvidos nos últimos dez anos. No trabalho realizado por Luciano e colaboradores (2004) camundongos foram envenenados experimentalmente com injeções intra-peritoneal contendo 1mg/Kg de veneno total de *L. intermedia*. Análises histopatológicas dos rins verificaram alterações morfológicas como: hialinização; eritrócitos no espaço de Bowman; colapso glomerular; citotoxicidade de células epiteliais tubulares; deposição de material eosinofílicos no lúmen tubular; citotoxicidade de células endoteliais e epiteliais glomerulares. Neste mesmo trabalho, a ligação direta de toxinas do veneno em

estruturas renais foi detectada por reações de imunofluorescência e ensaios de imunodeteção utilizando anticorpos que reconheciam o veneno total de *L. intermedia*.

Chaim e colaboradores (2006) estudaram a nefrotoxicidade resultante do veneno total de *L. intermedia* e relacionaram a toxina dermonecrótica LiRecDT1 com tais alterações renais. A toxina dermonecrótica presente no veneno de *L. intermedia* foi capaz de provocar as mesmas alterações teciduais provocadas pelo veneno total sobre células renais. Para verificar os efeitos de LiRecDT1, os camundongos foram envenenados experimentalmente com a toxina dermonecrótica recombinante, e amostras de lisados renais destes camundongos foram submetidas ao ensaio de imunodeteção utilizando IgG purificada que reconhece a toxina dermonecrótica.

Em outro estudo, células epiteliais renais (MDCK) foram tratadas com veneno total e proteínas recombinantes (LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3) de *L. intermedia* (RIBEIRO *et al.*, 2007). Foram observadas alterações da morfologia e da viabilidade celular. As isoformas LiRecDT1 e LiRecDT2 foram capazes de desenvolver a formação de vacúolos no citoplasma, alteração do espalhamento celular e perda da adesão célula-célula. Contudo, quando Ribeiro e colaboradores (2007) trataram as células epiteliais renais (MDCK) com LiRecDT3 não observaram alterações morfológicas nas células. Porém, em outros ensaios a LiRecDT3 apresentou atividade hemolítica e edematogênica. Contudo, os efeitos biológicos neste trabalho apresentaram uma taxa reduzida quando comparadas com as demais isoformas avaliadas (LiRecDT1 e LiRecDT2) (RIBEIRO *et al.*, 2007).

No presente trabalho utilizamos soro hiperimune anti-LiRecDT1 para reconhecimento de toxinas nos lisados renais de camundongos envenenados experimentalmente com o veneno total de *L. intermedia*. Na Figura 33, observamos o reconhecimento na altura de massa molecular compatível com as fosfolipases-D nativas (toxinas dermonecróticas) presentes no veneno total. A detecção destas toxinas no extrato de tecido sugere que estas toxinas se apresentam ligadas as estruturas renais dos camundongos. A existência da reação antígeno-anticorpo, visualizada na região de aproximadamente 36 kDa, em extratos de animais tratados e a ausência de reação no extrato não tratado indicam o reconhecimento de isoformas relacionadas à toxina LiRecDT1, e

descarta a possibilidade da ligação de anticorpos em estruturas renais. A existência da reação em ambos os lisados dos animais submetidos e não submetidos à perfusão indica que os antígenos se encontram presentes (ligados ou depositados) nas estruturas renais, descartando a possibilidade de estarem presente na circulação sanguínea do órgão. A Figura 33 mostra que a toxina encontra-se ligada a estruturas renais, confirmando resultados obtidos em trabalhos anteriores. O resultado obtido está de acordo com Dias-Lopes e colaboradores (2010) que detectaram por imunoensaio quantidades de veneno total no tecido renal de camundongos envenenados experimentalmente e que passaram pelo procedimento de perfusão antes de seus órgãos serem coletados. Este ensaio foi realizado com um número de animais bem reduzido pois se tratava de um ensaio-piloto para determinação da estratégia experimental mais adequada. Contudo, optamos por inseri-lo na dissertação pela relevância do resultado. Uma vez que foi a primeira vez que o grupo do LMEBV mostrou achados em tecidos renais após realização de perfusão, confirmando a presença de toxinas no tecido e não no sangue contido no órgão. Evidentemente, o ensaio será repetido com um número maior de animais para confirmação dos resultados. Outros trabalhos anteriores mostraram por imunofluorescência toxinas loxoscélicas localizadas em estruturas renais de animais expostos ao veneno (LUCIANO *et al.*, 2004) e toxina dermonecrótica utilizando os seus respectivos soros hiperimunes (CHAIM *et al.*, 2006).

No ensaio de imunodeteção apresentado na Figura 33 observamos dois precipitados (reação positiva) nas membranas que correspondem às amostras de camundongos envenenados submetidos e não submetidos à perfusão. Além do precipitado na altura de massa molecular (36kDa) referente as isoformas de fosfolipases-D, pode-se observar outro precipitado na altura de massa molecular de 48 kDa. Esta reação positiva pode ser referente à toxina dermonecrótica que esta associada a alguma proteína renal, ou ainda uma reação inespecífica do soro hiperimune com alguma proteína renal.



FIGURA 33: IMUNODETECÇÃO DA TOXINA LIRECDT1 EM EXTRATOS RENAIS DE CAMUNDONGOS ENVENENADOS EXPERIMENTALMENTE. As linhas 1, 2, 4 e 5 correspondem ao extrato renal de camundongo exposto ao veneno de *L. intermedia*. As linhas 1 e 4 correspondem ao extrato renal do camundongo que não passou pela técnica de perfusão. As linhas 2 e 5 correspondem ao extrato do camundongo submetido à técnica de perfusão pouco antes da coleta do órgão. As linhas 3 e 6 correspondem ao extrato renal de camundongo que não foram expostos ao veneno (controle negativo). As linhas 1, 2 e 3 representam amostras incubadas com o soro hiperimune que reconhece a toxina LiRecDT1 e as linhas 4, 5, 6 representam amostras que foram incubadas com soro pré imune (controle negativo).

Este resultado de imunodeteção corrobora com os resultados anteriores que mostraram detecção de toxinas em estruturas renais de animais envenenados, confirmando a especificidade dos anticorpos utilizados e reforça a ideia da viabilidade de aplicação destes soros hiperimunes para fins de imunodiagnóstico.

No Loxoscelismo, os dados científicos apontam para a relação dos sintomas renais com a deposição ou ligação das toxinas dermonecroticas ao tecido renal (LUCIANO *et al.*, 2004; CHAIM *et al.*, 2006). Os anticorpos livres se ligariam em antígenos ligados a estruturas renais, resultando em agressão renal no local da ligação. Os anticorpos ligados aos antígenos na superfície celular podem opsonizar células diretamente ou podem ativar o sistema complemento, o que resultaria na produção de proteínas do complemento que opsonizam células (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012). Desta forma, ocorreriam lesões na membrana por ativação da fagocitose, provocando

proteinúria e hematúria, os principais achados de doença renal desenvolvida após acidentes com aranhas do gênero *Loxosceles* (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012).

5 DISCUSSÃO FINAL

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que os soros hiperimunes de *Loxosceles intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* são capazes de reconhecer as toxinas recombinantes de *Loxosceles intermedia* LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3, LiRecDT5, LiRecDT6, LALP1, hialuronidase, LiKp e LiRecTCTP (Tabela 1). Os resultados sugerem uma conservação biológica dos epítomos imunogênicos entre as toxinas presentes nos três venenos de *Loxosceles*. Os soros hiperimunes produzidos contra as toxinas recombinantes de *L. intermedia* (LiRecDT1, LALP1, hialuronidase, Likp e LiRecTCTP) foram capazes de reconhecer toxinas relacionadas (portanto, com conservação biológica em epítomos imunogênicos) nos venenos de *L. laeta* e *L. gaucho* (Tabela 2).

Em alguns casos o reconhecimento só foi possível em uma das condições testadas ou ainda somente em um dos imunoenaios realizados, ocorrendo reconhecimento de apenas um tipo de epítomo conservado (linear ou conformacional). Contudo, o objetivo deste trabalho era mostrar a existência de conservação biológica entre toxinas loxoscélicas por meio da análise de epítomos imunogênicos e não comparar reconhecimentos entre espécies ou mesmo a intensidade de reconhecimento. O reconhecimento das toxinas recombinantes produzidas a partir do transcriptoma de *Loxosceles intermedia* pelo soro hiperimune que reconhece o veneno desta espécie era esperado e representa além de um controle positivo de reconhecimento, um perfil imunogênico para comparação (ainda que qualitativa) dos reconhecimentos obtidos com os demais soros hiperimunes.

Considerando os resultados experimentais obtidos verificamos que existe relação de epítomos conformacionais e lineares entre proteínas presentes nos venenos de diferentes espécies do gênero *Loxosceles*, especificamente nos venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*, o que mostra que há conservação biológica de toxinas entre estas espécies de aranha marrom. As ausências de reconhecimento imunológico nos imunoenaios utilizados neste estudo podem ser decorrentes de diversos fatores, os quais não descartam, necessariamente, a presença de conservação biológica entre as toxinas destas espécies. Os resultados negativos podem ser

decorrentes da baixa imunogenicidade das toxinas, ou mesmo da baixa representatividade destas nos venenos de *L. laeta* e *L. gaucho*. Estes fatores podem resultar em baixo reconhecimento imunológico nos imunoensaios realizados neste trabalho. Isto pode ser verificado quando, por exemplo, houve reação positiva na primeira etapa, quando foi utilizada a toxina recombinante imobilizada e os soros anti-venenos, e não houve reconhecimento na segunda etapa, quando o veneno estava imobilizado e os soros anti-toxinas foram utilizados. As diferenças de reconhecimento nos imunoensaios utilizados (ELISA e *western-blotting*) podem sugerir muitas hipóteses: podem estar relacionadas à existência de epítomos diferentes (lineares e conformacionais) nas isoformas das toxinas estudadas. Ainda, como já discutido anteriormente, diversos aspectos inerentes as limitações dos imunoensaios devem ser considerados ao analisar os resultados deste trabalho; por exemplo, a disposição espacial dos diferentes epítomos na molécula proteica (determinantes sobrepostos ou não sobrepostos); e ainda em raros casos, a ligação de um anticorpo pode levar à uma mudança conformacional da estrutura do antígeno, influenciando de maneira positiva ou negativa, a ligação de um segundo anticorpo.

O veneno é uma mistura muito complexa de proteínas e quando em contato com o sistema imune pode desencadear respostas diferentes frente à imunogenicidade de cada toxina. Uma característica importante da atividade biológica e tóxica dos venenos, que pode inclusive diferenciar a antigenicidade das toxinas de espécies diferentes, é a presença de diferentes perfis de glicosilação na estrutura das moléculas utilizadas como antígeno. Appel e colaboradores (2005) e Oliveira e colaboradores (2005), mostraram diferentes padrões de glicosilação nos venenos de *L. intermedia* e *L. laeta*. Apesar de o perfil de glicosilação das toxinas não fazer parte deste estudo, deve ser mencionado que os dados de transcriptoma, bem como a análise de sequências aminoacídicas, ainda que possam indicar possíveis sítios de glicosilação, não consideram o perfil de glicosilação das toxinas loxoscélicas.

A semelhança entre toxinas loxocélicas de diferentes venenos já foi estudada de diferentes formas em outros trabalhos. Gomez e colaboradores (2001) isolaram as porções ativas (frações cromatográficas) dos venenos de duas espécies de *Loxosceles*, *L. reclusa* e *L. deserta*, encontradas em

diferentes regiões dos Estados Unidos. A análise da sequência de aminoácidos (para ambas as espécies foram isolados os 35 primeiros aminoácidos da extremidade N-terminal) mostrou que somente três aminoácidos eram diferentes entre as sequências das duas espécies. E os soros anti-veneno de *L. reclusa* e *L. deserta* foram eficientes na detecção dos venenos das duas espécies e, também, na prevenção dos sinais de loxoscelismo cutâneo induzidos pelos venenos. A conclusão foi que os venenos de *L. reclusa* e *L. deserta* são similares e não apresentam diferenças em relação à antigenicidade.

Na maioria das vezes a vítima de loxoscelismo não consegue capturar a aranha logo após o acidente, ou mesmo a pessoa nem desconfia que foi picada (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). A lesão pode ser percebida apenas horas depois, pois a picada de aranha marrom é indolor. Deste modo, o diagnóstico é extremamente prejudicado, e muitas vezes pode ser errôneo. O loxoscelismo pode ser confundido com outras doenças, como infecções por estafilococos ou estreptococos, herpes simplex, herpes zoster, úlcera por diabetes, infecções fúngicas, entre outras (SWANSON E VETTER, 2006). Se o diagnóstico não for realizado por um profissional capacitado e experiente em detectar as características morfológicas e reconhecer uma lesão decorrente da picada de aranhas *Loxosceles*, o tratamento pode não ser feito corretamente e resultar em casos com graves complicações clínicas. Fatores como lesões crônicas (mais de dois meses de duração) e múltiplas lesões em um paciente podem excluir caso de loxoscelismo (STOECKER, GREEN, GOMEZ, 2006; SWANSON E VETTER, 2006). Levando em consideração estas dificuldades no diagnóstico, um teste experimental foi desenvolvido, utilizando a técnica de ELISA sanduíche para detecção de antígenos circulantes em camundongos envenenados experimentalmente (CHÁVEZ-OLÓRTEGUI *et al.*, 1998). Neste estudo os camundongos foram envenenados com diferentes venenos, incluindo venenos de aranhas, cobras e escorpiões. Os antígenos circulantes do veneno de *L. intermedia* nos soros de camundongos foram detectados, apresentando alta absorbância em comparação com os demais venenos. O imunodiagnóstico desenvolvido mostrou-se específico na identificação do envenenamento por *Loxosceles* (CHÁVEZ-OLÓRTEGUI *et al.*, 1998). Em um estudo de caso foi possível confirmar o diagnóstico de loxoscelismo pela técnica de ELISA

(STOECKER, GREEN, GOMEZ, 2006). Neste trabalho, utilizaram-se anticorpos policlonais purificados, produzidos contra o veneno total de *L. reclusa*. O material analisado foram amostras obtidas da lesão por meio de *swab*. A necessidade de um teste capaz de fazer diagnóstico diferencial do loxocelismo é evidente. A alta conservação biológica entre as toxinas loxoscélicas de diferentes venenos no que se refere aos epítomos imunogênicos pode e deve ser utilizada para o desenvolvimento de um teste comercialmente viável.

Estudos mais recentes fizeram avaliação de epítomos isoladamente. Com a ajuda da técnica de expressão de peptídeos na superfície de fagos (*Phage Display*), epítomos presentes na toxina dermonecrótica de *L. intermedia* (isoforma 1) foram delineados e quatro mimotopos (peptídeos miméticos de antígenos) foram obtidos e utilizados para a produção de soros hiperimunes (MOURA *et al.*, 2011). Os soros foram testados e a capacidade de neutralização avaliada. O resultado mostrou que apenas um dos epítomos preditos (NCNKNDHLFACW) foi capaz de neutralizar alguns efeitos tóxicos do veneno total de *L. intermedia* (dermonecrose e hemorragia). Este mesmo epítomo foi reconhecido por anticorpos monoclonais produzidos para reconhecer proteínas dermonecróticas de *L. intermedia* (nomeado LimAb7). Trabalhos anteriores, caracterizaram prováveis epítomos da proteína dermonecrótica recombinante (recLiD1) de *L. intermedia* por predição a partir da cadeia aminoacídica (FELICORI *et al.*, 2006). Uma das sequências antigênicas foi analisada quanto a sua localização na estrutura tridimensional da toxina dermonecrótica de *L. laeta* (estrutura disponível na época). Esta sequência localiza-se na parte N-terminal da toxina e é encontrada em muitas isoformas de toxinas dermonecróticas de outras espécies (FELICORI *et al.*, 2006). Em 2009, Felicori e colaboradores avaliaram os diferentes peptídeos imunogênicos da toxina recombinante LiD1 (de *L. intermedia*), quanto a sua capacidade de proteger coelhos imunizados dos efeitos da toxina LiD1. A capacidade de neutralização observada para os peptídeos e mesmo para a toxina recombinante foi bastante baixa (50% e 80%, respectivamente). Recentemente, uma das sequências antigênicas caracterizada em 2006 por Felicori e colaboradores foi sintetizada e avaliada por meio de ensaios *in vivo* e imunoenaios com o uso de soro anti-peptídeo (DIAS-LOPES *et al.*, 2010b). Os

efeitos da proteína dermonecrótica recombinante, tais como dermonecrose e hemorragia, foram neutralizados por este soro anti-peptídeo, apresentando 70% de proteção dos efeitos tóxicos. Uma baixa neutralização do edema foi observada, característico no loxoscelismo, na maioria dos trabalhos que utilizaram soros produzidos contra epítomos da toxina dermonecrótica, estes resultados indicam que outros peptídeos imunogênicos devem ser identificados para compor uma mistura de imunização capaz de propiciar o desenvolvimento de uma boa taxa de neutralização (MOURA *et al.*, 2011; FELICORI *et al.*, 2009, 2006; DIAS-LOPES *et al.*, 2010b). Os resíduos de aminoácidos presentes nestes epítomos são os mesmos envolvidos com o sítio e *loop* catalítico da toxina. Este fato sugere uma hipótese para o esclarecimento das bases moleculares da capacidade de neutralização de anticorpos anti-peptídeo: a possível ligação dos anticorpos em aminoácidos envolvidos na atividade enzimática da toxina, causando o impedimento da ligação enzima-substrato e desencadeando o efeito neutralizante ou protetor. O mesmo aconteceria com a ligação do anticorpo no *loop* catalítico, que desorganizaria as pontes de hidrogênio presentes no *loop* (DIAS-LOPES *et al.*, 2010b; FELICORI *et al.*, 2006). Dias-Lopes e colaboradores (2010a) mostraram completa anulação na ligação da toxina às células cardíacas, por meio de anticorpos monoclonais. Hipóteses foram levantadas a fim de tentar explicar este resultado. Como o fato de que o anticorpo poderia se ligar a uma região da toxina perto do sítio de interação com a célula. Ou ainda, que a ligação do anticorpo monoclonal a rLiD1 poderia alterar o local de interação com a célula, prejudicando a ligação ao sítio catalítico da enzima. Diferenças de epítomos presentes em toxinas de 32-35 kDa (fosfolipases-D ou toxinas dermonecróticas) inter-espécies foram verificadas anteriormente, utilizando anticorpos monoclonais produzidos para reconhecer a toxina dermonecrótica de *L. gaucho* (GUILHERME, FERNANDES, BARBARO, 2001). Por meio de imunoenaios, o resultado foi uma baixa reatividade cruzada do anticorpo monoclonal e o veneno total de *L. intermedia* e também o não reconhecimento do veneno total de *L. laeta*. Além de verificar a ausência da neutralização de efeitos tóxicos resultantes da atividade de toxinas dermonecróticas em animais envenenados com veneno total de *L. intermedia* e *L. laeta*. Enquanto que em animais envenenados com o veneno de *L. gaucho*, a neutralização de efeitos tóxicos foi de 90-97% quando

o anticorpo monoclonal foi administrado nas seis primeiras horas após o envenenamento. Sugeriu-se a existência de diferentes epítomos presentes nas toxinas dermonecróticas entre espécies de aranhas do gênero *Loxosceles* (GUILHERME, FERNANDES, BARBARO, 2001). A ausência de reatividade cruzada deste anticorpo com diferentes venenos é decorrente da alta especificidade do anticorpo monoclonal, que muito provavelmente é específico para uma região antigênica característica de *Loxosceles gaucho*. A existência de conservação biológica entre os epítomos imunogênicos das toxinas loxoscélicas de diferentes venenos não exclui a possibilidade de existirem epítomos imunogênicos específicos de cada espécie.

A LiRecDT1H12A é uma isoforma 1 da toxina dermonecrótica mutada experimentalmente, que apresenta uma substituição de apenas 1 aminoácido, uma alanina no lugar de um resíduo de histidina na posição 12. Os ensaios *in vivo* e *in vitro* mostraram que a isoforma mutada apresenta redução da atividade catalítica (KUSMA *et al.*, 2008). Contudo, esta mutação não provocou alteração na estrutura secundária da proteína, nem na apresentação de seus epítomos. Recentemente, Chaim e colaboradores (2011b) por meio de imunoensaios mostraram a reatividade cruzada de LiRecDT1 e LiRecDT1H12A. Estas informações evidenciam possíveis aplicações biotecnológicas da toxina LiRecDT1H12A para a produção de soros e ou vacinas; contudo, mais estudos são necessários para viabilizar esta utilização.

Os anticorpos policlonais e/ou monoclonais são amplamente utilizados como ferramentas científicas em diferentes áreas de pesquisa. Na área da toxinologia, estes estudos apresentam diversos objetivos como esclarecer características intrínsecas dos venenos de espécies distintas (encontradas em diferentes regiões); avaliar a reatividade imunológica cruzada de soros frente a venenos totais e proteínas recombinantes, imunolocalizar veneno ou toxinas específicas em tecidos ou células, e estudar atividade biológica do veneno ou toxinas específicas. Olvera e colaboradores (2006) desenvolveram um estudo com o objetivo de avaliar a reatividade cruzada de soros inter-espécies. Com o auxílio da biotecnologia de anticorpos, juntamente com técnicas de biologia molecular, foram desenvolvidos diferentes soros com a capacidade de reconhecer proteínas dermonecróticas de diferentes espécies (*L. laeta*, presente na América do Sul; e *L. boneti* e *L. reclusa*, presentes na América do

Norte). Observaram a neutralização *in vivo* de efeitos provocados pelo veneno e pela toxina dermonecrótica na avaliação cruzada entre soros que reconhecem veneno total de *L. boneti* e *L. reclusa*. Em contrapartida, nenhum dos soros produzidos com o objetivo de reconhecer os venenos das espécies da América do Norte conseguiram neutralizar efeitos tóxicos das toxinas recombinantes de *L. laeta* (isoforma 1 e 2); o mesmo foi observado na reação inversa (OLVERA *et al.*, 2006). Neste mesmo estudo, a eficiência de antissoros produzidos contra toxina dermonecrótica não apresentou diferenças em relação à posição da cauda de histidina na proteína recombinante (C ou N terminal). Portanto, a localização da cauda de histidina não afeta significativamente a apresentação dos epítomos no caso da toxina dermonecrótica das espécies estudadas (*L. laeta*, *L. boneti* e *L. reclusa*). Sendo assim, sugere-se que a presença da cauda de histidina nas toxinas de *L. intermedia* utilizadas para a produção de anticorpos usados na segunda etapa deste trabalho não deve ser considerada como um possível fator de interferência no desenvolvimento de imunogenicidade nos animais utilizados para produção do soro hiperimune e, consequentemente, nos anticorpo hiperimune.

Recentemente, um estudo utilizou fragmentos F(ab')₂ anti-veneno de *L. intermedia* para detectar antígenos do veneno em extratos de rim, coração, pulmão e fígado, em ELISA sanduíche, após envenenamento experimental por *L. intermedia*. Neste estudo, novamente a susceptibilidade renal ao Loxoscelismo foi evidenciada, os rins foram os órgãos mais afetados pelo envenenamento (DIAS-LOPES *et al.*, 2010a).

Os resultados do ensaio de imunodeteção de toxinas em extratos teciduais (FIGURA 33) reforçam resultados obtidos pelo nosso grupo em trabalhos anteriores (LUCIANO *et al.*, 2004; CHAIM *et al.*, 2006). A afinidade da toxina dermonecrótica a estruturas renais já havia sido evidenciada em estudos prévios. Em conjunto, estes trabalhos mostram a importância das toxinas recombinantes e soros policlonais como bioferramentas no desenvolvimento dos conhecimentos relacionados aos processos fisiopatológicos e imunológicos desenvolvidos no loxoscelismo e/ou quando um organismo envenenado experimentalmente, exposto ao veneno total ou toxina recombinante. Assim como as toxinas recombinantes, os antissoros são ferramentas biológicas essenciais para o estudo científico em diversos campos da área biomédica.

Outros estudos mostraram que epítomos presentes nas toxinas dermonecróticas são fortes determinantes antigênicos; e portanto, bioferramentas com inúmeras aplicações (RIBEIRO *et al.*, 2007; DA SILVEIRA *et al.*, 2006; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). Como por exemplo, o trabalho desenvolvido por Chaim e colaboradores (2006) utilizou anticorpos policlonais purificados para reconhecer a toxina dermonecrótica (LiRecDT1) de *L. intermedia* em tecido renal de animais envenenados experimentalmente, confirmando o envolvimento desta toxina com a nefrotoxicidade observada no loxoscelismo. Nos ensaios de imunofluorescência com antissoro sobre tecidos renais, revelaram a ligação da toxina em estruturas deste tecido. Neste estudo, a própria toxina recombinante foi injetada em camundongos. Em um trabalho anterior (LUCIANO *et al.*, 2004), foi utilizado o veneno total nos animais e a partir do uso de anticorpos policlonais purificados verificou-se a presença de toxina nas lâminas histológicas de tecido renal.

Os resultados do presente trabalho corroboram com resultados da literatura científica. A análise do transcriptoma de *L. intermedia*, realizada por Gremski e colaboradores (2010), mostra que os dados obtidos para *L. intermedia* foram muitas vezes similares aos dados obtidos pela análise do transcriptoma de *L. laeta* (FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2008), sugerindo-se uma estreita relação evolutiva entre as espécies. As semelhanças nos perfis de diferentes espécies se tornam de fácil compreensão quando olhamos estas moléculas como fatores indispensáveis para a biologia e fisiologia das aranhas, como sua alimentação, defesa e sobrevivência. Contudo, diferenças na composição do veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* são observadas e podem resultar de uma combinação de fatores. Em análises comparativas mostradas em trabalhos anteriores, percebeu-se que tais variações estão ligadas ao sexo da aranha, habitat, ontogenia e estratégias para capturar a presa. Além de diferenças no padrão de expressão e nas modificações pós-traducionais, evidenciadas por variações dos sítios de glicosilação (ZOBEL-THROPP, BODNER, BINFORD, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 1999). Como mostrado por Barbaro (1996) análises inter-espécies apontaram o veneno total de *L. intermedia* como responsável por uma maior toxicidade quando comparado com o veneno de *L. laeta* e *L. gaucho*.

Os resultados do presente estudo evidenciam a conservação biológica das toxinas loxoscélicas de *L. laeta*, *L. intermedia* e *L. gaucho* (isoformas de fosfolipases-D, metaloproteases do tipo astacinas, hialuronidases, peptídeos inseticidas e LiRecTCTP) por meio de epítomos imunogênicos.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo visou analisar as diferenças e similaridades em relação à imunogenicidade dos venenos de aranhas do gênero *Loxosceles*. Considerando as três espécies de aranhas-marrons de importância médica no Sul e Sudeste do Brasil, *L. laeta*, *L. intermedia* e *L. gaucho*, podemos concluir que há conservação biológica de epítomos imunogênicos lineares e/ou conformacionais entre as toxinas dos venenos destas espécies. Estes resultados reforçam a ideia da existência de famílias interespecies de toxinas loxoscélicas, já mostrada na literatura científica. Especificamente, concluímos que:

1. Houve a expressão heteróloga e purificação em condições adequadas de pureza e solubilidade da toxina dermonecrótica (LiRecDT6). Possibilitando o uso da toxina nos imunoenaios.
2. Os soros policlonais que reconhecem os venenos totais de *L. laeta* e *L. gaucho* foram capazes de reconhecer as toxinas recombinantes de *Loxosceles intermedia*: LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3, LiRecDT5, LiRecDT6, LALP, hialuronidase, LiKp e LiRecTCTP.
3. Os soros policlonais que reconhecem as toxinas recombinantes de *L. intermedia* (LiRecDT1, LALP1, hialuronidase, LiKp e LiRecTCTP) reconheceram toxinas relacionadas nos venenos de *L. laeta* e *L. gaucho*.
4. Observou-se a imunodeteção de toxinas loxoscélicas relacionadas à LiRecDT1 em extrato de tecido renal de camundongos submetidos a envenenamento experimental com veneno de *L. intermedia*.

Os resultados do presente estudo além de evidenciarem a conservação biológica das toxinas loxoscélicas de *L. laeta*, *L. intermedia* e *L. gaucho* por meio de epítomos imunogênicos, apresentam a finalidade de somar conhecimentos à sorologia de animais imunizados com diferentes venenos totais e diferentes toxinas recombinantes. Adicionalmente, reforçam-se as possíveis aplicações biotecnológicas destes antissoros no que se refere a prevenção, diagnóstico e tratamento do Loxoscelismo, além da sua utilização

como ferramentas científicas na toxinologia viabilizando o melhor entendimento da fisiopatologia do Loxoscelismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. Sétima Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. Quinta Edição. Porto Alegre: Artmed, 2010.

ALMEIDA, D. M.; FERNANDES-PEDROSA, M. F.; ANDRADE, R. M. G.; MARCELINO, J. R.; GONDO-HIGASHI, H.; AZEVEDO, I. L. M. J.; LEE HO, P.; VAN DEN BERG, C.; TAMBOURGI, D. V. A New Anti-loxoscelic Serum Produced Against Recombinant Sphingomyelinase D: Results of Preclinical Trials. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, n.3, p. 463-470, 2008.

ANDRADE, R. M. G.; OLIVEIRA, K. C.; GIUSTI, A. L.; SILVA, W. D.; TAMBOURGI, D. V. Ontogenic development of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, v. 37, p. 627-632, 1999.

ANDRADE, R. M. G.; LOURENÇO, W. R.; TAMBOURGI, D. V. Comparison of the fertility between *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta* spiders. **J Arachnol**, v.28, p. 245-247, 2000.

APPEL, M. H.; DA SILVEIRA, R. B.; GREMSKI, G.; VEIGA, S. S. Insights into brown spider and loxoscelism. **Invertebrate Survival Journal**, v. 2, p. 152-158, 2005.

APPEL, M. H.; DA SILVEIRA, R. B.; CHAIM, O. M.; PALUDO, K. S.; SILVA, D. T.; CHAVES, D. M.; DA SILVA, P. H.; MANGILI, O. C.; SENFF-RIBEIRO, A.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1780, p. 167-178, 2008.

BARBARO, K. C.; EICKSTEDT, V. R. D.; MOTA, I. Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important *Loxosceles* (Araneae) species in Brazil. **Toxicon**, v.32, p. 113–20, 1994.

BARBARO, K. C.; FERREIRA, M. L.; CARDOSO, D. F.; EICKSTEDT, V. R. D.; MOTA, I. Identification and neutralization of biological activities in the venoms of *L.* spiders. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.29, p.1491-1497, 1996.

BARBARO, K. C.; KNYSACK, I.; MARTINS, R.; HOGAN, C.; WINKEL, K. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. **Toxicon**, v. 45, p. 489-499, 2005.

BINFORD, G. J.; BODNER, M. R.; CORDES, M. H.; BALDWIN, K. L.; RYNERSON, M. R.; BURNS, S. N.; ZOBEL-THROPP, P. A. Molecular evolution, functional variation, and proposed nomenclature of the gene family

that includes sphingomyelinase D in sicariid spider venoms. **Mol Biol Evol**, v. 26, n. 3, p. 547-566, 2009.

BOMMER, U. A.; THIELE, B. J. The translationally controlled tumour protein (TCTP). **The international journal of biochemistry & cell biology**, v.36, p. 379-385, 2004.

BRADFORD, M. A.; A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye-Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CATALAN, A. D.; CORTES, W. A.; SAGUA, H. S.; GONZALEZ, J. A.; ARAYA, J. E. Two New Phospholipase D Isoforms of *Loxosceles laeta*: Cloning, Heterologous Expression, Functional Characterization, and Potential Biotechnological Application. **J Biochem Molecular Toxicology**, v. 00, n. 0, p. 1-11, 2011.

CHAIM, O. M.; SADE, Y. B.; DA SILVEIRA, R. B.; TOMA, L.; KALAPOTHAKIS, E.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; VON DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; SANCHES VEIGA, S. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 211, p. 64-77, 2006.

CHAIM, O. M.; TREVISAN-SILVA, D.; CHAVES-MOREIRA, D.; WILLE, A. C. M.; FERRER, V. P.; MATSUBARA, F. H.; MANGILI, O. C.; da SILVEIRA, R. B.; GREMSKI, L. H.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. Brown Spider (*Loxosceles* genus) Venon Toxins: Tools For Biological Purposes. **Toxins**, v.3, p. 309-344, 2011a.

CHAIM, O. M.; DA SILVEIRA, R. B.; TREVISAN-SILVA, D.; FERRER, V. P.; SADE, Y. B.; BÓIA-FERREIRA, M.; GREMSKI, L. H.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO A.; TAKAHASHI, H. K.; TOLEDO, M. S.; NADER, H. B.; VEIGA S. S. Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 181, p. 84-96, 2011b.

CHAVES-MOREIRA, D.; CHAIM, O. M.; SADE, Y. B.; PALUDO, K.S.; GREMSKI, L. H.; DONATTI, L.; MOURA, J.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DA SILVEIRA, R. B.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S.S. Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom. **J Cell Biochem**, v. 107, p.655-666, 2009.

CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; ZANETTI, V. C.; FERREIRA, A. P.; MINOZZO, J. C.; MANGILI, O. C.; GUBERT, I. C. ELISA for the detection of venom antigens in experimental and clinical envenoming by *Loxosceles intermedia* spiders. **Toxicon**, v. 36, n. 4, p. 563-569, 1998.

CRISTOFF, A. O.; de OLIVEIRA, A; CHAIM, O.M.; LUGARINI, D.; PEREIRA, A.L.B.P.; PALUDO, K.S.; TELLES, J.E.Q.; BRACHT, A.; VEIGA, S.S.; ACCO,

A. Effects of the venom and the dermonecrotic toxin LiRecDT1 of *Loxosceles intermedia* in the rat liver. **Toxicon**, v. 52, n. 6, p. 695-70, 2008.

CROWTHER, J. R. **Methods in Molecular Biology**: The ELISA Guidebook. New Jersey: Humana Press, 2001.

CUNHA, R. B.; BARBARO, K. C.; MURAMATSU, D.; PORTARO, F. C. V.; FONTES, W.; SOUSA, M. V. Purification And Characterization Of Loxnecrogin, A Dermonecrotic Toxin From *Loxosceles Gaucho* Brown Spider Venom. **J. Protein Chem**, v.22, p.135-146, 2003.

da SILVA, P. H.; SILVEIRA, R. B.; APPEL, M. H.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, v. 44, p. 693-709, 2004.

da SILVEIRA, R. B.; RIGOZZO, R. B.; CHAIM, O. M.; APPEL, M. H.; DREYFUSS, J. L.; TOMA, L.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Molecular cloning and functional characterization of two isoform of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom gland. **Biochimie**, v.88, p.1241–1253, 2006.

da SILVEIRA, R. B.; CHAIM, O. M.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Hyauronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo-b-N-acetyl-D-hexosaminidases hydrolases. **Toxicon**, v.49, p.758-768, 2007a.

da SILVEIRA, R. B.; WILLE, A. C. M.; CHAIM, O. M.; APPEL, M. H.; SILVA, D. T.; FRANCO, C. R. C.; TOMA, L.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease from *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom. **Biochemical Journal**, v.406, p. 355-363, 2007b.

da SILVEIRA, R. B.; PIGOZZO, R. B.; CHAIM, O. M.; APPEL, M. H.; TREVISAN-SILVA, D.; DREYFUSS, J. L.; TOMA, L.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: From cloning to functional characterization. **Biochimie**, v. 89, p.289-300, 2007c.

de CASTRO, S. C.; SILVESTRE, F. G.; ARAÚJO, S. C.; YAZBEC, G. M.; MANGILI, O. C.; CRUZ, I.; CHAVES-OLÓRTEGUI, C.; KALAPOTHAKIS, I. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*, **Toxicon**, v.44, p.273-280, 2004.

de LIMA, M. E.; FIGUEIREDO, S. G.; PIMENTA, A. M. C.; SANTOS, D. M.; BORGES M. H.; CORDEIRO, M. N.; RICHARDSON, M.; OLIVEIRA, L. C.; STANKIEWICZ, M.; PELHATE, M. Peptides of arachnid venoms with insecticidal activity targeting sodium channels. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.146, p. 264–279, 2007.

de MOURA, J.; FELICORI, L.; MOREAU, V.; GUIMARÃES, G.; DIAS-LOPES, C.; MOLINA, L.; ALVARENGA, L. M.; FERNANDES, P.; FRÉZARD, F.; RIBEIRO, R. R.; FLEURY, C.; NGUYEN, C.; MOLINA, F.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Protection against the toxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by mimotope peptides. **Vaccine**, v. 29, p. 7992-8001, 2011.

DIAS-LOPES, C.; FELICORI, L.; GUIMARÃES, G.; GOMES, E. R. M.; ROMAN-CAMPOS, D.; DUARTE, H.; DAMASCENO, D.; MARTINS, M.; KALAPOTHAKIS, E.; ALMEIDA, A. P.; GRANIER, C.; CRUZ, J. S.; GUATIMOSIM, S.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Cardiotoxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom and the recombinant venom toxin rLiD1. **Toxicon**, in press, 2010a.

DIAS-LOPES, C.; GUIMARÃES, G.; FELICORI, L.; FERNANDES, P.; EMERY, L.; KALAPOTHAKIS, E.; NGUYEN, C.; MOLINA, F.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. A protective immune response against lethal, dermonecrotic and hemorrhagic effects of *Loxosceles intermedia* venom elicited by a 27-residue peptide. **Toxicon**, v. 55, p. 481-487, 2010b.

dos SANTOS, V. L.; FRANCO, C. R.; VIGGIANO, R. L.; da SILVEIRA, R. B.; CANTÃO, M. P.; MANGILI, O. C.; VEIGA S. S.; GREMSKI, W. Structural and ultrastructural description of the venom gland of *Loxosceles intermedia* (brown spider). **Toxicon**, v. 38, n. 2, p. 265-285, 2000.

EICKSTEDT, V. R. Aranhas de importância médica no Brasil. Em: **Venenos animais** 1ª ed. Ed. Barravera, B., Epuc, São Paulo, p. 151, 1994.

ESCOUBAS, P.; DIOCHORT, S.; CORZO, G. Structure and pharmacology of venom neurotoxins. **Biochimie**, v. 82, p. 893-907, 2000.

FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S.; ELIAS, M. C.; GRANER, E.; MANGILI, O. C.; BRENTANI, R. R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon**, v.36, n.7, p.1039–1051, 1998.

FELICORI, L.; ARAUJO, S. C.; de AVILA, R. A.; SANCHEZ, E. F., GRANIER, C.; KALAPOTHAKIS, E.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Functional characterization and epitope analysis of a recombinant dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider. **Toxicon**, v. 48, n. 5, p. 509-519, 2006.

FELICORI, L.; FERNANDES, P. B.; GIUSTA, M. S.; DUARTE, C. G.; KALAPOTHAKIS, E.; NGUYEN, C.; MOLINA, F.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. An in vivo protective response against toxic effects of the dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by synthetic epitopes. **Vaccine**, v. 27, n. 31, p. 4201-8, 2009.

FERNANDES-PEDROSA, M. F.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; KOBASHI, L. S.; ALMEIDA, D. D.; HO, P. L.; TAMBOURGI, D. V. Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. **BMC Genomics**, v. 9, p. 279, 2008.

FERNANDES-PEDROSA, M. F.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; VAN DEN BERG, C. W.; RAMOS, C. R.; HO, P. L.; TAMBOURGI, D. V. Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 298, n. 5, p. 638-645, 2002.

FERREIRA, A. M.; SOARES, C. A. A. Aracnídeos peçonhentos: análise das informações nos livros didáticos de ciências. **Revista Ciência e Educação**, v. 14, n. 2, p. 307-314, 2008.

FERRER, V. P.; **Clonagem e expressão heteróloga de hialuronidase e alérgeno presentes no veneno de *Loxosceles intermedia* (aranha marrom)**, Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)- Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, CURITIBA, 2010.

FISCHER, M. L.; VASCONCELLOS-NETO, J. Microhabitats occupied by *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta* (Araneae: Sicariidae) in Curitiba, Paraná, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v.42, p.756-765, 2005.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **The American journal of the medical sciences**, v. 304, p. 261-267, 1992.

GOMEZ, H. F.; MILLER, M. J.; TRACHY, J. W.; MARKS, R. M.; WARREN, J. S. Intradermal anti-loxosceles Fab fragments attenuate dermonecrotic arachnidism. **Academic emergency medicine**, v.6, p.1195-1202, 1999.

GOMEZ, H. F.; MILLER, M. J.; WAGGENER, M. W.; LANKFORD, H. A.; WARREN, J. S. Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important North American *Loxosceles* spider species. **Toxicon**, v.39, p.817-824, 2001.

GREMSKI, L. H.; DA SILVEIRA, R. B.; CHAIM, O. M.; PROBST, C. M.; FERRER, V. P.; NOWATZKI, J.; WEINSCHUTZ, H. C.; MADEIRA, H. M. F.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Molecular Biosystems**, v. 6, p. 2403-2416, 2010.

GUILHERME, P.; FERNANDES, I.; BARBARO, K. C. Neutralization of dermonecrotic and lethal activities and differences among 32-35 kDa toxins of medically important *Loxosceles* spider venoms in Brazil revealed by monoclonal antibodies. **Toxicon**, v. 39, n. 9, p. 1333-1342, 2001.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual**. Primeira Edição. New York: Cold Spring Harbor, 1998.

JANEWAY, Charles. **Imunobiologia**: o sistema imune na saúde e na doença. Porto Alegre: Artmed, 2007.

KALAPOTHAKIS, E.; ARAUJO, S. C.; CASTRO, C. S.; MANDES, T. M.; GOMEZ, M. V.; MANGILI, O. C.; GUBERT, I. C.; CHAVEZ-OLÓRTEGUI, C. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, v.40, p.1691-1699, 2002.

KALAPOTHAKIS, E.; CHATZAK, M. GONÇALVES-DORNEL, H. de CASTRO, C. S.; SILVESTRE, F. G.; LABORNE, F. V.; de MOURA, J. F.; VEIGA, S. S. CHÁVES-OLÓRTEGUI, C.; GRANIER, C.; BARBARO, K. C. The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão) venom. **Toxicon**, v.50, p.938-946, 2007.

KUSMA, J.; CHAIM, O. M., WILLE, A. C., FERRER, V. P., SADE, Y. B., DONATTI, L.; GREMSKI, W., MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. **Biochimie**, v.90, p. 1722-1736, 2008.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p. 680-685, 1970.

LEE, S.; LYNCH, K. R.; Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). **Biochem J**, v. 391, p. 317-323.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, Michael M. Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: Artmed, 2011.

LUCAS, S. Spiders in Brazil. **Toxicon**, v. 26, p. 759-772, 1988.

LUCIANO, M. N.; SILVA, P. H.; CHAIM, O. M.; SANTOS, V. P.; FRANCO, C. R. C.; SOARES, M. F. S.; ZANATA, S. M.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom on renal tissue. **J. Histochem. Cytochem**, v. 52, p. 455-467, 2004.

MACHADO, L. F., LAUGESSEN, S., BOTELHO, E. D., RICART, C. A., FONTES, W., BARBARO, K. C., ROEPSTORFF, P., SOUSA M. V. Proteome analysis of Brown spider venom: identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. **Proteomics**, v.5., p.2167-2176, 2005.

MATSUBARA, F. H. **Clonagem e expressão heteróloga de um peptídeo da família das notinas presente no veneno de aranha marrom (*Loxosceles intermedia*)**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)-Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, CURITIBA, 2011.

MEISSNER, G.O.; **Produção e avaliação de anticorpos policlonais contra venenos totais de *Loxosceles laeta* e de *Loxosceles gaucho***. Monografia

(Bacharelado em Ciências Biológicas) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, CURITIBA, 2009.

MULENGA, A.; MACALUSO, K. R.; SIMSER, J. A.; AZAD, A. F. The American dog tick, *Dermacentor variabilis*, encodes a functional histamine release factor homolog. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 33, p. 911-919, 2003.

MURAKAMI, M. T.; FERNANDES-PEDROSA, M. F.; TAMBOURGI, D. V.; ARNI, R. K. Structural basis for metal ion coordination and the catalytic mechanism of sphingomyelinases D. **J Biol Chem**, v. 280, n. 14, p. 13658-64, 2005.

OLIVEIRA, K. C.; ANDRADE, R. M. G.; GIUSTI, A. L.; SILVA, W. D.; TAMBOURGI, D. V. Sexlinked variation of *Loxosceles intermedia* spider venoms. **Toxicon**, v.37, p.217-221, 1999.

OLIVEIRA, K. C.; ANDRADE, R. M. G.; PIAZZA, R. M. F.; FERREIRA, J. M. C.; VAN DEN BERG, C. W.; TAMBOURGI, D. V. Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. **Toxicon**, v. 45, p. 421-429, 2005.

OLVERA, A.; RAMOS-CERRILLO, B.; ESTÉVEZ, J.; CLEMENT, H.; DE ROODT, A.; PANIAGUA-SOLÍS, J.; VÁZQUEZ, H.; ZAVALA, A.; ARRUZ, M.S.; STOCK, R. P.; ALAGÓN, A. North and South American *Loxosceles* spiders: development of a polyvalent antivenom with recombinant sphingomyelinases D as antigens. **Toxicon**, v.48, p.64-74, 2006.

OSPEDAL, K. Z.; APPEL, M. H.; NETO, J. F.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **International journal of experimental pathology**, v.84, p.287-294, 2002.

PALUDO, K. S.; GREMSKI, L. H.; VEIGA, S. S.; CHAIM, O. M.; GREMSKI, W.; DE FREITAS BUCHI, D.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P.; FRANCO, C. R. The effect of brown spider venom on endothelial cell morphology and adhesive structures. **Toxicon**, v.47, p.844-853, 2006.

PAULI, I.; MINOZZO, J. C.; da SILVA, P. H.; CHAIM, O. M.; VEIGA, S. S. Analysis of therapeutic benefits of antivenin at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the brown spider (*Loxosceles intermedia*). **Toxicon**, v.53, p.660-671, 2009.

PLATNICK, N. I. 2012. **The World Spider Catalog**, Version 12.5. American Museum of Natural History. Disponível em: <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/SICARIIDAE.html>. Acesso em 21/02/2012.

RAMOS-CERRILLO, B.; OLVERA, A.; ODELL, G. V.; ZAMUDIO, F.; PANIAGUA-SOLÍS, J.; ALAGÓN, A.; STOCK, R. P. Genetic and enzymatic

characterization of sphingomyelinase D isoforms from the North American fiddleback spiders *Loxosceles boneti* and *Loxosceles reclusa*. **Toxicon**, v. 44, p. 507-514, 2004.

RASH, L. D.; HODGSON W. C. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. **Toxicon**, England, v.40, p. 225-254, 2002.

RIBEIRO, C. A. O.; REIS FILHO, H. S.; GRÖTZNER, S. R. **Técnicas e Métodos para Utilização Prática de Microscopia**. Primeira Edição. Curitiba: Santos, 2011.

RIBEIRO, R. O.; CHAIM, O. M.; DA SILVEIRA, R. B.; GREMSKI, L. H.; SADE, Y. B.; PALUDO, K. S.; SENFF-RIBEIRO, A.; DE MOURA, J.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v. 50, p. 1162-1174, 2007.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Immunologia**. 6 ed. São Paulo: Manole, 2006.

RUPPERT, E.E.; FOX, R.S.; BARNES, R.D. **Zoologia dos invertebrados**, Editora. Roca. 6ª ed. São Paulo, 1996.

SADE, Y. B.; **Clonagem, expressão e purificação de uma proteína da superfamília TCTP (Translationally Controlled Tumor Protein) a partir de biblioteca de cDNA da glândula produtora de veneno de aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*)**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)-Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, CURITIBA, 2009.

SADE, Y. B.; BÓIA-FERREIRA, M.; GREMSKI, L. H.; da SILVEIRA, R. B.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O. M.; VEIGA, S. S. Molecular cloning, heterologous expression and functional characterization of a novel translationally-controlled tumor protein (TCTP) family member from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **The International Journal of Biochemistry e Cell Biology**, v. 44, p.170-177, 2012.

SAEZ, N. J.; SENFF, S.; JENSEN, J. E.; ER, S. Y.; HERZIG, V.; RASH, L. D.; KING, G. F. Spider-Venom Peptides as Therapeutics. **Toxins**, v. 2, p. 2851-2871, 2010.

SAMS, H. H.; DUNNICK, C. A.; SMITH, M. L.; KING, J. R. L. E. Necrotic arachnidism. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.44, n.4, p.561-573, 2001.

SANDIDGE, J. S. Arachnology: scavenging by brown recluse spiders. **Nature**, v. 30, p.426-430, 2003.

SENFF-RIBEIRO, A.; da SILVA H. P.; CHAIM, O. M.; GREMSKI, L. H.; PALUDO, K. S.; da SILVEIRA, R. B.; GREMSKI, W.; MANGILI, O. C.; VEIGA,

S. S. Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. **Biotechnol Adv**, v. 26, p. 210-218, 2008.

SESA - SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE AMBIENTAL DO PARANÁ. **Acidentes por animais peçonhentos**, PARANÁ, 2012. Disponível em: <http://www.saude.pr.gov.br>. Acesso em 15/01/2012.

SEZERINO, U. M.; ZANNIN, M.; COELHO, L. K.; GONÇALVES, J.; GRANDO, M.; MATTOSINHO, S. G.; BARBARO, K. C. A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. **Transactions of the Royal Society of tropical medicine and hygiene**, v.92, p.546–548, 1998.

SINAN - SISTEMA NACIONAL DE NOTIFICAÇÕES DE AGRAVOS, **Ministério da Saúde**, BRASIL, 2010. Disponível em: <http://www.saude.gov.br>. Acesso em: 15/01/2012.

STOECKER, W. V.; GREEN, J. A.; GOMEZ, H. F. Diagnosis of loxoscelism in a child confirmed with an enzyme-linked immunosorbent assay and noninvasive tissue sampling. **J Am Acad Dermatol**, v. 55, n. 5, p. 888-890, 2006.

SWANSON, D. L.; VETTER, R. S. Loxoscelism. **Clinics in dermatology**, United States, v.24, p.213-221, 2006.

TAMBOUGI, D. L.; FERNANDES-PEDROSA, F. M.; VAN DEN BERG, C. W.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; FERRACINI, M.; PAIXÃO-CAVALCANTE, D.; MORGAN, B. P.; RUSHMERE, N. K. Molecular cloning, expression, function and immunoreactivities of members of a gene family of sphingomyelinases from *Loxosceles* venom glands. **Mol Immunol**, v. 41, n. 8, p. 831-840, 2004.

TELERMAN, A.; AMSON, R. The molecular programme of tumour reversion: the steps beyond malignant transformation. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, p. 206-216, 2009.

TREVISAN-SILVA, D.; GREMSKI, L. H.; CHAIM, O. M.; da SILVEIRA, R. B. MEISSNER, G. O.; MANGILI, O. C.; BARBARO, K. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S.; SENFF-RIBEIRO, A. Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*). **Biochimie**, v. 92, p.21-32, 2010.

VEIGA, S. S.; da SILVEIRA, R. B.; DREYFUSS, J. L.; HAOACH, J.; PEREIRA, A.M.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W. Identification of high molecular weight serineproteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v.38, p.825-839, 2000.

VEIGA, S. S.; ZANETTI, V. C.; BRAZ, A.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W. Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. **Brasilian Journal of medical and biological research**, v.34, p.843-850, 2001.

VUITIKA, L. **Clonagem, expressão heteróloga e caracterização biológica de uma nova isoforma de fosfolipase-D do veneno de Aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*)**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e

Molecular)-Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, CURITIBA, 2012.

ZOBEL-THROPP, P. A.; BODNER, M. R.; BINFORD, G. J. Comparative analyses of venoms from American and African Sicarius spiders that differ in sphingomyelinase D activity. **Toxicon**, v. 55, n.7, p. 1274-1282, 2010.

ANEXOS

ANEXO I: Alinhamento das sequencias aminoacídicas das fosfolipases-D de *Loxosceles spp.*

LiRecDT1	1	MLPYIVLVLCWSVLSQAAQTDEERACNRRPIWMGHMVNAIGQIDEFVNLGANSIETD
SMaseD	1	-----ACNRRPIWMGHMVNAIGQIDEFVNLGANSIETD
LiRecDT2	1	-----DVEERADKRRPIWMGHMVNAIGQIDEFVNLGANSIETD
LiRecDT6	1	MLCFEVLFFCGGVILEGADIDEIEHADKRRPIWMGHMVNAIGQIDEFVNLGANSIETD
SMase	1	MYAHIALILSCWTVVLQGAETDVGERADNRRPIWNLAHMVNAIGQIDEFVNLGANSIETD
rLiPLD1	1	MYVHIALILSCWTVVLQGAETDVGERADNRRPIWNLAHMVNAIGQIDEFVNLGANSIETD
LiRecDT3	1	MLLPVATSFIVYAVFLQEAHGAERASRPPIWLAHMVNDLGNDEYLDLGANGIELD
LiRecDT5	1	MOLEIILCLAGSAVQLGTELDVGVERADNRRPIWNLAHMVNDKGTIDEYLDLGANSVESD
LiRecDT1	61	60VSFDNANPEYTYHGIPCDGGRNCKKYENFNDFLKLRSATTPGNSKYQERLVLVVF
SMaseD	35	34VSFDNANPEYTYHGIPCDGGRNCKKYENFNDFLKLRSATTPGNSKYQERLVLVVF
LiRecDT2	40	39VSFDNANPEYTYHGIPCDGGRSCDKWENFNDFLKLRSATTPGNAKYQAKLILVVF
LiRecDT6	61	60VTFKSNANPEYTYHGIPCDGRWCKKWEYVNDFLKLRSATTPGNAKYRSLILVVF
SMase	61	60VTFKG-SVPEYTYHGIPCDGRDGRWEYFNVFLKLREYTPGNAKYRDLGILVVL
rLiPLD1	61	60VTFKG-SVPEYTYHGIPCDGRDGRWEYFNVFLKLREYTPGNAKYRDLGILVVL
LiRecDT3	61	60VETADTAQKMYHGIPCDGRSCDTEGFTKYNDYLRQLTPGNSKFKSLILITM
LiRecDT5	61	60VSFDSNEKPKMLHGSPCDCGRSCKRQMSADYLDYMRQLTPGDEKFERNLILVVL
LiRecDT1	118	DLK 120TGSLYDNCANDAGKKLAKNLLQHYWNGNGNGGRAYIVLSIPDLNHYPLIKGFK
SMaseD	92	DLK 94TGSLYDNCANDAGKKWAKNLLQHYWNGNGNGGRAYIVLSIPDLNHYPLIKGFKD
LiRecDT2	97	DLK 99TGSLYDNCANEAGKKLAKNLLQHYWNGNGNGGRAYIVLSIPDLNHYPLIKGFKD
LiRecDT6	118	DLK 120TDYLTASTAYDAGKDFAKRLQHYWNGNGNGGRAYIVLSIPDLNHYPLIKGFK
SMase	117	DLK 119TGSLSNDQVRPAGENVAKELLQHYWNGNGNGGRAYIVLSIPDLNHYPLIKGFK
rLiPLD1	117	DLK 119TGSLSNDQVRPAGENVAKELLQHYWNGNGNGGRAYIVLSIPDLNHYPLIKGFK
LiRecDT3	118	DLK 120LNGTEENVAAGKSVAEKLSGYWNGKSGARAYIVLSIPDLNHYPLIKGFK
LiRecDT5	118	DLK 120LKKLSSEQASAGQEVASQMLDKYWKRGESGARAYIVLSIPDLNHYPLIKGFK
LiRecDT1	174	DLK 180HEELMDKVGHDFSG-----NDDIGDVGRAYKKAGITG--HIWQSDGITN
SMaseD	149	DLK 154HEELMDKVGHDFSG-----NDDISDVGRAYKKAGITG--HIWQSDGITNS
LiRecDT2	154	DLK 159HEELMDKVGHDFSG-----NDAIGDVGNAYKKAGISG--HVWQSDGITNC
LiRecDT6	174	DLK 180HEELMDKVGHDFSG-----NEDISSTRAAFKAGQDKEHIWQSDGITN
SMase	173	DLK 179HEELMDKVGHDFSGPYLPSLPTLDATHEAYKKAGWDG--HIWQSDGITN
rLiPLD1	173	DLK 179HEELMDKVGHDFSGPYLPSLPTLDATHEAYKKAGWDG--HIWQSDGITN
LiRecDT3	174	DLK 180HEELMDKVGHDFSG-----NEDLGETRVRVYKAGWDG--HIWQSDGITN
LiRecDT5	174	DLK 180FQYREKVGVDVDFSG-----NEDLEDTGKILKSRDLTD--HIWQSDGITN
LiRecDT1	223	CLPRG-LSRVN 232AAVANRDS-ANGFINKVYYWTVDKRSTTRDALDAGVDGIMTNYPD
SMaseD	198	LPRG-LSRVN 206AAVANRDS-ANGFINKVYYWTVDKRSTTRDALDAGVDGIMTNYPDV
LiRecDT2	203	LURG-LDRVK 211QAIANRDS-ANGFINKVYYWTVDKRSTTRDALDAGVDGIMTNYPDV
LiRecDT6	225	CLPRG-LSRVN 232AAVANRDS-SNGFINKVYYWTVDKRSTTRDALDAGVDGIMTNYPN
SMase	227	FSPFGDVARLK 237BAIKSRDS-ANGFINKVYYWTVDKRSTTRDALDAGVDGIMTNYPN
rLiPLD1	227	FSPFGDVARLK 237BAIKSRDS-ANGFINKVYYWTVDKRSTTRDALDAGVDGIMTNYPN
LiRecDT3	223	CLPRG-DYRLT 232BAMKKRNDPNYKMTIKVYVWSIDKSSIRNALRGVDAVMTNYPA
LiRecDT5	223	CLPRG-MKRLK 232AAIRKRD--SNGFINKVYYWTVDKRSTTRDALDAGVDGIMTNYPN
LiRecDT1	277	VITDVINEAAKKKF 291RVATYDENPWVTEKK 306
SMaseD	252	ITDVINEAAKKKF 265RVATYDDNPWVTEKK 280
LiRecDT2	257	ITDVINESAYKKKF 270RVASYEDNPWETEEK 285
LiRecDT6	279	VITDVINEENDEKKKF 293RMATYDDNPWETEEK 307
SMase	282	VITDVINEENDEKKKF 296RLATYDDNPWETEEK 311
rLiPLD1	282	VITDVINEENDEKKKF 296RLATYDDNPWETEEK 311
LiRecDT3	278	RVKSTIRESESGTH 292RMATYDDNPWQK-- 304
LiRecDT5	276	RIVSVINERESEKTF 290RLATYDDNPWETEEK 305

FIGURA 1: ALINHAMENTO DAS SEQUENCIAS AMINOÁCIDICAS MOSTRAM A POSITIVIDADE ENTRE DIFERENTES ISOFORMAS DE FOSFOLIPASES-D DE *Loxosceles spp.* (*L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*). Obtidas pelo alinhamento global gerado pelo ClustalW. As sequências comparadas e seus respectivos n° de acesso no GenBank são: *L. intermedia***: LiRecDT1 (dermonecrotic toxin isoform 1- ABA62021.1) (CHAIM *et al.*, 2006), LiRecDT2 (dermonecrotic toxin isoform 2-ABB69098.1), LiRecDT3 (dermonecrotic toxin isoform 3- ABB71184.1) (DA SILVEIRA *et al.*, 2006), LiRecDT5 (dermonecrotic toxin isoform 5- ABD91847.1) (DA SILVEIRA *et al.*, 2007c), LiRecDT6 (dermonecrotic toxin isoform 6- ABO87656.1) (APPEL *et al.*, 2008). ***L. laeta***: SMase I (sphingomyelinase I- AAM21154.1) (FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2002), rLiPLD1 (phospholipase D isoform 1- ADP00408) (CATALAN *et al.*, 2011). ***L. gaucho***: SMase D 1 (dermonecrotic protein 1- AAY42401.1) (SILVESTRE *et al.*, não publicado). Os resíduos de aminoácidos conservados são mostrados em preto; resíduos de aminoácidos de mesmo caráter químico são mostrados em cinza; resíduos de aminoácidos não conservados são mostrados em branco.**

ANEXO II: Tabela de positividade entre as sequências aminoacídicas das fosfolipases-D de *Loxosceles* spp.

Positividade estrutural (%)	LiRecDT2	LiRecDT3	LiRecDT5	LiRecDT6
LiRecDT1	89	45	50	64
LiRecDT2		45	50	67
LiRecDT3			52	46
LiRecDT5				50

TABELA 1: PERCENTAGEM DE POSITIVIDADE DE AMINOÁCIDOS ENTRE DIFERENTES ISOFORMAS DE FOSFOLIPASES-D DE *Loxosceles intermedia*. Obtidas pelo alinhamento global gerado pelo ClustalW. As sequências comparadas e seus respectivos n° de acesso no GenBank são: ***L. intermedia***: **LiRecDT1** (*dermonecrotic toxin isoform 1-* ABA62021.1) (CHAIM *et al.*, 2006), **LiRecDT2** (*dermonecrotic toxin isoform 2-* ABB69098.1), **LiRecDT3** (*dermonecrotic toxin isoform 3-* ABB71184.1) (DA SILVEIRA *et al.*, 2006), **LiRecDT5** (*dermonecrotic toxin isoform 5-* ABD91847.1) (DA SILVEIRA *et al.*, 2007c), **LiRecDT6** (*dermonecrotic toxin isoform 6-* ABO87656.1) (APPEL *et al.*, 2008).

Positividade estrutural (%)	LiRecDT1	LiRecDT2	LiRecDT3	LiRecDT5	LiRecDT6
SMase I	59	61	42	48	58
rLiPLD1	60	61	42	49	58
SMase D 1	97	88	45	51	66

TABELA 2: PERCENTAGEM DE POSITIVIDADE DE AMINOÁCIDO ENTRE DIFERENTES ISOFORMAS DE FOSFOLIPASES-D DE *Loxosceles* spp. (*L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*). Obtidas pelo alinhamento global gerado pelo ClustalW. As sequências comparadas e seus respectivos n° de acesso no GenBank são: ***L. intermedia***: **LiRecDT1** (*dermonecrotic toxin isoform 1-* ABA62021.1) (CHAIM *et al.*, 2006), **LiRecDT2** (*dermonecrotic toxin isoform 2-* ABB69098.1), **LiRecDT3** (*dermonecrotic toxin isoform 3-* ABB71184.1) (DA SILVEIRA *et al.*, 2006), **LiRecDT5** (*dermonecrotic toxin isoform 5-* ABD91847.1) (DA SILVEIRA *et al.*, 2007c), **LiRecDT6** (*dermonecrotic toxin isoform 6-* ABO87656.1) (APPEL *et al.*, 2008). ***L. laeta***: **SMase I** (sphingomyelinase I- AAM21154.1) (FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2002), **rLiPLD1** (phospholipase D isoform 1- ADP00408) (CATALAN *et al.*, 2011). ***L. gaucho***: **SMase D 1** (*dermonecrotic protein 1-* AAY42401.1) (SILVESTRE *et al.*, não publicado).

ANEXO III: Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)

Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso de Animais
(CEUA)

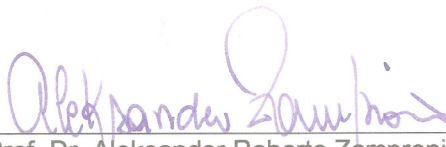
**Nº 578****CERTIFICADO**

O Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

PROCESSO: 23075.108146/2011-95**APROVADO:** 15/12/2011 – R.O. 11/2011**TÍTULO:** Identificação e avaliação da conservação biológica de toxinas loxoscélicas pela utilização de toxinas recombinantes e soros policlonais**AUTORES:** Andrea Senff Ribeiro, Daniela Regina Buch, Silvio Sanches Veiga, Olga Meiri Chaim, Herculano S. Reis Filho**DEPARTAMENTO:** Biologia Celular


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador do CEUA